



**DISEÑO Y SÍNTESIS DE SISTEMAS DENDRÍTICOS PARA LA
PRESENTACIÓN DE BIOMOLÉCULAS DE INTERÉS
TERAPÉUTICO**

Ainhoa Mascaraque González

Sevilla, 2013



Instituto de Investigaciones
Químicas



Departamento
de Química Orgánica



cicCartuja centro de
investigaciones científicas
isla de la cartuja

Centro de Investigaciones
Científicas Isla de la
Cartuja

**DISEÑO Y SÍNTESIS DE SISTEMAS DENDRÍTICOS PARA LA
PRESENTACIÓN DE BIOMOLÉCULAS DE INTERÉS
TERAPEÚTICO**

Memoria presentada por la
Licenciada Ainhoa Mascaraque González
para optar al grado de Doctora en Química

Sevilla, 2013

Dr. Francisco Javier Rojo Marcos, Investigador Científico del C.S.I.C.

CERTIFICA: Que el presente trabajo titulado: "Diseño y Síntesis de Sistemas Dendríticos para la Presentación de Biomoléculas de Interés Terapéutico" ha sido realizado bajo mi dirección y asesoramiento en los laboratorios del Instituto de Investigaciones Químicas del Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja (Sevilla) constituyendo la Memoria que presenta la Lcda. Ainhoa Mascaraque González para aspirar al grado de Doctora en Química.

Sevilla, Julio de 2013

Fdo.: Francisco Javier Rojo Marcos

El presente trabajo ha sido realizado por la licenciada Ainhoa Mascaraque González con una beca FPI asociada al proyecto CTQ2008-01694/BQU del MICINN, en el Laboratorio de Glicosistemas del Instituto de Investigaciones Químicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC - Universidad de Sevilla) bajo la dirección del Dr. F. Javier Rojo Marcos. El trabajo ha sido tutelado por la Profesora Inmaculada Robina Ramírez en el marco del Programa de Doctorado en Química.

Fdo. Ainhoa Mascaraque González

F. Javier Rojo Marcos

Director del trabajo

Inmaculada Robina
Ramírez

Tutora del trabajo

Sevilla, Julio de 2013

[Escribir texto]

Agradecimientos

ABREVIATURAS

μL	Micro litro
μM	Micromol/litro
A	Adenina
aa	Aminoácido
Ab	Anticuerpo (del inglés, <i>antibody</i>)
APC	Célula Presentadora de Antígeno (del inglés, <i>Antigen Presenting Cell</i>)
acpP	Proteína acil-trasportadora (del inglés, <i>acyl carrier protein</i>)
Ac	Acetilo
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Aha	<i>L</i> -Homoazidoalanina
Ahx	Ácido 6-aminohexanoico
Ar	Arilo
ARN	Ácido ribonucleico
Asc. Na	Ascorbato sódico
BH20	Polímeros dendríticos hiperramificados de tipo Boltorn de segunda generación (del inglés, <i>Boltorn hyperbranched dendritic polymers</i>)
BH30	Polímeros dendríticos hiperramificados de tipo Boltorn de tercera generación (del inglés, <i>Boltorn hyperbranched dendritic polymers</i>)
Bis-MPA	Ácido 2,2-bis-(hidroximetil)propiónico (<i>del inglés 2,2-Bis(hydroxy-methyl)propionic acid</i>)
Boc	<i>tert</i> -butiloxicarbonilo
BODIPY	Boro-dipirrometeno (del inglés, <i>boron-dipyrromethene</i>)
BSA	Albúmina del suero bovino (<i>del inglés</i> Bovine Serum

	Albumin)
C	Citosina
C'	Extremo C terminal de una secuencia peptídica o mimético
C60	Fullereno de 60 átomos de carbono
Cbz ò Z	Benciloxicarbonilo (del inglés, <i>carboxybenzyl</i>)
CD4+	Células T colaboradoras <i>naïve</i> o T _H 0
CD80	Cúmulo de diferenciación 80 (del inglés <i>Cluster of differentiation</i>)
CD86	Cúmulo de diferenciación 86 (del inglés <i>Cluster of differentiation</i>)
CLR	Lectina Tipo C (del inglés, <i>C-type Lectin Receptor</i>)
CpG	Motivos citosina desmetilada-guanosina del ADN de procariontes y virus
CRD	Dominio de reconocimiento de carbohidratos (<i>del inglés Carbohydrate Recognition Domain</i>)
CSF	Factor de estimulación de colonias (del inglés, <i>Colony Stimulating Factor</i>)
CTL	Linfocitos T citotóxicos (del inglés, <i>Cytotoxic T Lymphocytes</i>)
CuAAC	Cicloadición 1,3-dipolar entre azidas y alquinos catalizada por cobre (del inglés, <i>Cu-catalyzed Alkyne Azide Cycloaddition</i>)
d	Doblete
DC	Célula dendrítica (del inglés, <i>Dendritic Cells</i>)
DCC	Diciclohexil carbodiimida
DC-SIGN	Lectina no integrina presente en células dendríticas que reconoce ICAM-3 selectivamente (del inglés, <i>Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin</i>)
dd	Doble doblete
DIEA ò DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina

DIFO	Ciclooctino difluorado (del inglés, <i>difluorinated cyclooctyne</i>)
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N'</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
dsARN	ARN de doble hebra (del inglés, <i>double stranded ARN</i>)
DPTS	<i>p</i> -toluensulfonato de dimetilaminopiridinio
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés, <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
eq	Equivalente
EM (ESI)	Espectrometría de Masas con Ionización por Electrospray
EMAR	Espectrometría de Masas de Alta Resolución
ER	Retículo Endoplasmático (del inglés, <i>Endoplasmic Reticulum</i>)
Fc	Cadena pesada constante de un anticuerpo
Fab	Parte variable de un anticuerpo (del inglés, <i>Fragment antigen binding</i>)
<i>fabI</i>	Enoil-ACP(acyl carrier protein) reductasa
Fmoc	9-Fluorenilmetiloxycarbonilo
G	Guanina
G _n	Generación n
GalNAc	<i>N</i> -acetilgalactosamina
GC-DC	Célula Dendrítica de Centro Germinal (del inglés, <i>Germinal Center Dendritic Cell</i>)
GDP	Glicodendropéptido
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglucosamina
gp120	Glicoproteína 120

HA	Hemaglutinina
HATU	Hexafluorofosfato de <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio
HBTU	Hexafluorofosfato de <i>O</i> -Benzotriazole- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio
HMBC	Correlación heteronuclear a múltiples enlaces (del inglés, <i>Heteronuclear Multiple Bond Connectivity</i>)
HMQC	Correlación heteronuclear multiple cuántica (del inglés, <i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>)
HOBt	Hidroxibenzotriazol
Hpg	<i>L</i> -Homopropargilglicina
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento (del inglés, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IC ₅₀	Concentración para una inhibición del 50%
ICAM-2	Molécula de adhesión intercelular-2 (del inglés, <i>Intercellular Adhesion Molecule 2</i>)
ICAM-3	Molécula de adhesión intercelular-3 (del inglés, <i>Intercellular Adhesion Molecule 3</i>)
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
LAM	Lipoarabinomanano
LC-MS	Cromatógrafo de líquidos acoplado a espectrómetro de masas
LGG	Linfocitos Granulosos Grandes
LPS	Lipopolisacárido
m	Multiplete
m/z	Relación masa/carga
MALDI-TOF	Espectrometría de masas por ionización mediante desorción

por láser asistido por una matriz con detección por tiempo de vuelo (del inglés *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight*).

mARN	ARN mensajero
Man	D-Manosa
MAP	Péptido antigénico múltiple (del inglés, <i>Multiple Antigen Peptide</i>)
MBHA	Resina de poliestireno con grupos de 4-metil bencihidrilamina
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MGL	Lectina tipo galactosamina de macrófagos (del inglés, <i>Macrophage Galactosamine-type Lectin</i>)
mM	Milimol/litro
MR	Receptor de manosa (del inglés, <i>Mannose Receptor</i>)
N'	Extremo <i>N</i> terminal de una secuencia peptídica o mimético
NA	Neuraminidasa
NAP-5	Columnas preempaquetadas con gel Sephadex G-25 (Grado ADN)
N3-dPEG(4)-NHS	15-Azido-4-7-10-13-tetraoxa-pentadecanoato de <i>N</i> -hidroxisuccinimida
NHC	<i>N</i> -Heterociclos de carbeno
NHS	<i>N</i> -Hidroxisuccinimida
NK	Linfocitos T citotóxicos (del inglés, <i>Natural Killer</i>)
NLR	Receptor tipo Nod (del inglés, <i>Nod-like Receptor</i>)
nM	Nanomol/litro
NMP	<i>N</i> -metilpirrolidona
ODN	Oligodeoxinucleótido
O ₂ Oc	Ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico

OPV	Vacuna oral contra la polio (del inglés, <i>Oral Poliomyelitis Vaccine</i>)
OVA	Proteína ovoalbúmina
PAF	Factor de activación plaquetaria (del inglés, <i>Platelet Activation Factor</i>)
PAMAM	Poli(amidoamina)
PAMPs	patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>)
PGN	Peptidoglicano
PNA	Ácido nucleico peptídico (del inglés, <i>Peptide Nucleic Acid</i>)
PPI	Poli(propilenimina)
PTO-CpG	Secuencia de un Oligonucleótido con motivos citosina desmetilada guanosina con una modificación en el grupo fosfato (del inglés, <i>Phosphothioate Oligonucleotide</i>)
ρ -TsOH	Ácido ρ -toluensulfónico
Pf	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones (del inglés, <i>Pattern Recognition Receptor</i>)
QMP	Resina Quadrasil [®] MP (Mercaptopropil)
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RP-HPLC	HPLC de fase reversa (del inglés, <i>Reverse Phase-HPLC</i>)
s	Singlete
sa	Singlete ancho
SPPS	Síntesis en fase sólida de péptidos (del inglés, <i>Solid Phase Peptide Synthesis</i>)
SPR	Resonancia del plasmón de superficie (del inglés <i>Surface Plasmon Resonance</i>)
T	Temperatura

T	Timina
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
TBTA	Tris[(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina
<i>t</i> BuOH	<i>tert</i> -Butanol
T _C	Linfocitos T citotóxicos
TCR	Receptor de linfocitos T (del inglés, <i>T-Cell Receptor</i>)
TFA	Ácido trifluoroacético
TFMSA	Ácido trifluotrometanosulfónico
TGF	Factor de crecimiento transformador (del inglés, <i>Transforming Growth Factor</i>)
T _H	Linfocitos T colaboradores (del inglés, <i>T helper cell</i>)
THF	Tetrahidrofurano
TIS	Triisopropilsilano
TLC	Cromatografía en capa fina (del inglés <i>Thin layer chromatography</i>)
TLR	Receptor tipo Toll (del inglés <i>Toll-like Receptor</i>)
TNF	Factor de necrosis tumoral (del inglés, <i>Tumoural Necrosis Factor</i>)
T _{reg}	Linfocito T regulador
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

ÍNDICE

1.Introducción	1
1.1. El Sistema Inmune	1
1.2. Células Especializadas del Sistema Inmunitario	3
1.2.1. Linfocitos	4
1.2.1.1. Células o linfocitos B	4
1.2.1.2. Células o linfocitos T	5
1.2.1.3. Células asesinas o Natural Killer (NK) o Linfocitos Granulosos Grandes (LGG)	6
1.2.2. Fagocitos	7
1.2.2.1. Fagocitos mononucleares	7
1.2.2.2. Células dendríticas (DC)	7
1.2.2.3. Polimorfonucleares neutrófilos	8
1.2.2.4. Polimorfonucleares eosinófilos	8
1.2.3. Células auxiliares	9
1.2.3.1. Basófilos y mastocitos.....	9
1.2.3.2. Plaquetas.....	9
1.2.3.3. Células endoteliales.....	9
1.3. Mediadores Solubles de la Inmunidad	9
1.3.1. Sistema del complemento.....	10
1.3.2. Citocinas.....	10
1.3.3. Anticuerpos	11
1.4. Células Dendríticas	12
1.4.1. Sistema Inmune Innato.....	12
1.4.2. Células Dendríticas y Receptores de Reconocimiento de Patrones Celulares (PRRs)	13
1.4.3. Receptores de tipo Toll o TLRs	15
1.4.4. Lectinas Tipo C	18
1.5. Sistemas Multivalentes y su Aplicación en Nanomedicina.....	24
1.5.1. Dendrímeros y Dendrones.....	26

1.5.2.	Glicodendrimeros	29
1.5.3.	Química Click	33
2.	Antecedentes y Objetivos	45
2.1.	Antecedentes	45
2.2.	Objetivos	54
3.	Síntesis mediante Química Click de Glicodendropéptidos como Modelo de Vacuna Sintética	59
3.1.	Sistemas Peptídicos y su Aplicación al Desarrollo de Vacunas Sintéticas	59
3.1.1.	Vacunación: Diseño Racional mediante el Conocimiento del Sistema Inmune	59
3.1.2.	Sistemas MAP (Multiple Antigen Peptide systems)	63
3.1.3.	Aplicaciones de los MAPs	67
3.1.4.	Manosilación de Péptidos y Proteínas	68
3.1.5.	Péptidos Inmunogénicos de Interés Terapéutico como Epítomos para la Construcción de Sistemas Multivalentes	71
3.2.	Objetivos	77
3.3.	Síntesis de Glicodendropéptidos (GDPs) como Plataforma de Presentación Multivalente de Epítomos de Interés Biológico	78
3.3.1.	Síntesis Convergente de los Glicodendrones de Manosa Tri- y Nonavalentes (Man_mN_3) mediante CuAAC	80
3.3.2.	Síntesis de Dendrones Maleimida (D_pAlq)	86
3.3.2.1.	Síntesis del Dendrón Divalente $\text{D}_2\text{-Alq}$ (13)	86
3.3.2.2.	Síntesis del Dendrón Tetraivalente $\text{D}_4\text{-Alq}$ (20)	88
3.3.3.	Preparación de Péptidos y MAPs utilizando Síntesis en Fase Sólida (SPPS)	91
3.3.4.	Síntesis de GDPs mediante el Método Directo	95
3.3.5.	Síntesis de GDPs mediante el Método Indirecto	100
3.3.6.	Síntesis de Glicodendrones-Maleimida, como Plataforma Versátil para la Obtención de GDPs. Aproximación Divergente	106
3.3.7.	Síntesis de GDPs a través de Glicodendrones-Maleimida Intermedios	109

3.4.	Evaluación biológica	110
4.	Sistemas Dendríticos en el Diseño de Vacunas frente a la Hipersensibilidad Inmediata Tipo I o Alergia.....	115
4.1.	Hipersensibilidad Inmediata Tipo I. Activación de TLRs en el Desarrollo de Vacunas contra la Alergia.....	115
4.2.	Objetivos	121
4.3.	Síntesis de Dendropéptidos Funcionalizados con una Secuencia de ADN CpG Inmunoestimuladora para el Desarrollo de Vacunas Sintéticas frente a Hipersensibilidad Inmediata de Tipo I.....	122
4.3.1.	Síntesis de Dendropéptidos de Ole e 1 ₁₀₉₋₁₃₀	122
4.3.2.	Síntesis de Secuencias de ADN Adecuadamente Funcionalizadas	124
4.3.3.	Conjugación de los Dendropéptidos de Ole ₁₀₉₋₁₃₀ a las Secuencias de ADN Adecuadamente Funcionalizadas	127
4.4.	Evaluación Biológica	128
5.	Conjugados PNA-Glicodendrón para el Desarrollo de Agentes Antisentido	135
5.1.	Peptide Nucleic Acids (PNAs): Introducción y Perspectivas.....	135
5.1.1.	Uso de Oligonucleótidos como Agentes Terapéuticos.....	135
5.1.2.	Síntesis de PNAs	137
5.1.3.	Peptide Nucleic Acids (PNAs) en las Terapias Antigénica y Antisentido. Efecto Antisentido de PNAs en el Crecimiento Bacteriano y su Potencial Aplicación en Biotecnología.....	142
5.2.	Objetivos	146
5.3.	Síntesis de Conjugados PNA para su Potencial Aplicación en el Diseño de Agentes Antisentido	147
5.3.1.	Síntesis de Secuencias de PNA adecuadamente Funcionalizadas para su Posterior Conjugación <i>via</i> CuAAC.....	147
5.3.2.	Síntesis del Control Negativo de Etilenglicol	153
5.3.3.	Síntesis de Conjugados PNA-Glicodendrón y PNA-Control Negativo	157
5.4.	Evaluación Biológica	162
6.	Conclusiones	169

7. Parte Experimental	173
7.1. Disolventes y Reactivos	173
7.2. Técnicas y aparatos.	173
7.3. Procedimientos Sintéticos y Caracterización Estructural de los Compuestos Preparados	174
7.3.1. Síntesis de Glicodendrones	174
7.3.2. Síntesis de Dendrones Maleimida (D_p -Alq)	184
7.3.2.1. Síntesis del Dendrón Divalente 13 (D_2 -Alq)	184
7.3.2.2. Síntesis del Dendrón Tetraivalente 20 (D_4 -Alq).....	187
7.3.3. Síntesis de Péptidos y MAPs.....	192
7.3.3.1. Síntesis de Péptidos y MAPs funcionalizados con un grupo alquino	192
7.3.3.2. Síntesis de Péptidos y MAPs funcionalizados con un grupo tiol	195
7.3.4. Síntesis de Glicodendropéptidos (GPDs)	196
7.3.4.1. Primera aproximación	196
7.3.4.2. Aproximación Divergente	200
7.3.5. Síntesis de Conjugados ADN-dendropéptido.....	205
7.3.5.1. Síntesis de Dendropéptidos del Alergeno Ole e $1_{109-130}$ 205	
7.3.5.2. Síntesis de ADN y PTO Adecuadamente Funcionalizados	206
7.3.6. Síntesis de PNAs y sus Correspondientes Conjugados	206
7.3.6.1. Síntesis en Fase Sólida de las Secuencias de PNA.....	206
7.3.6.2. Síntesis del Control Negativo de Carbohidrato.....	212
7.3.6.3. Síntesis de Conjugados PNA-dendrón nonavalente	217
Anexo 1	219
Anexo 2	225
Anexo 3	229

Capítulo

1

Introducción

1. Introducción

1.1. El Sistema Inmune

El *sistema inmune* o *sistema inmunitario* es un sistema constituido por un gran número de órganos y tejidos diseminados por todo el cuerpo, que se encarga de elaborar una respuesta de defensa frente a un microorganismo determinado (Figura 1).¹ Su función fisiológica es la defensa frente a elementos exógenos.

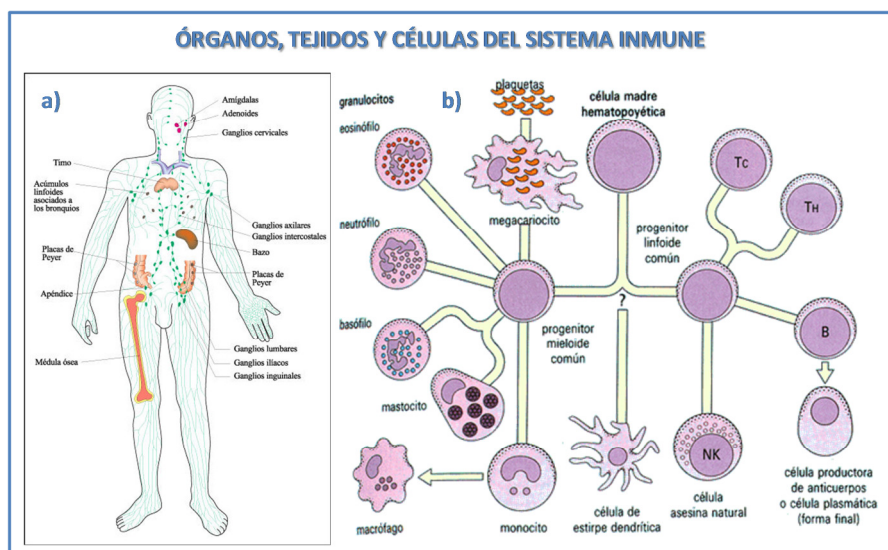


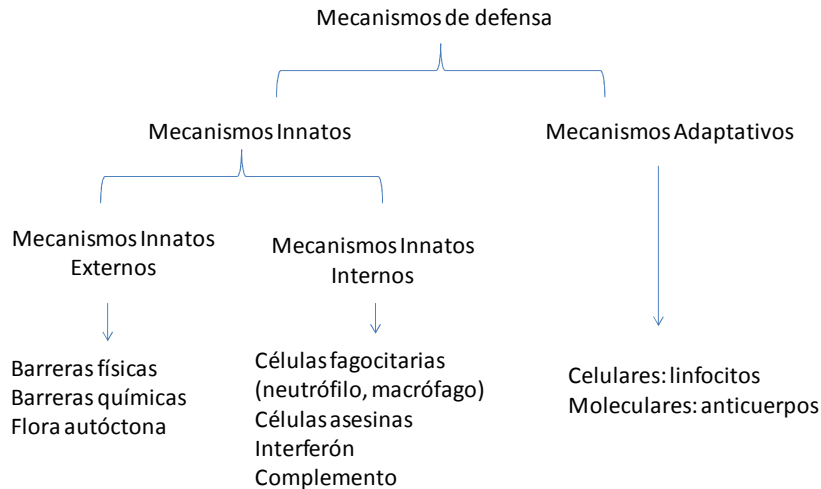
Figura 1. Órganos, tejidos y células que constituyen el sistema inmune, responsables de la defensa del organismo frente a patógenos.

Las sustancias exógenas que inducen respuestas inmunes o que son el blanco de las mismas, se denominan *antígenos*. Originalmente, el término antígeno se aplicó a cualquier molécula capaz de inducir la producción de anticuerpos específicos por parte de las células B (el término procede del inglés, *antibody generator*, generador de anticuerpos) aunque en la actualidad, dicho término se utiliza en un sentido mucho más amplio y se aplica a cualquier molécula que pueda ser reconocida específicamente por cualquiera de los elementos del sistema inmunitario.

Las respuestas inmunitarias se pueden dividir en dos categorías: las *respuestas inmunitarias innatas o no específicas*, que reconocen estructuras moleculares

¹ I. Roitt, J. Brostoff, D. Male, *Immunology 5th Edition* Harcourt/Mosby, 2003.

compartidas por muchos microorganismos, y las *respuestas inmunitarias adaptativas o adquiridas*, que presentan una alta especificidad con respecto a un determinado patógeno (Esquema 1).



Esquema 1. Esquema de clasificación de los mecanismos de defensa del organismo.

El *sistema inmunológico innato* actúa inmediatamente después de la invasión de un patógeno, o incluso antes de que se produzca (Figura 2).² Este tipo de inmunidad proporciona la primera línea de defensa frente a los microorganismos.^{3,4}

Por el contrario, el *sistema adaptativo* desencadena respuestas inmunes estimuladas por un agente determinado, que aumentan en intensidad y efectividad en cada sucesiva exposición al mismo (Figura 2). Las principales características que definen a la inmunidad adaptativa son, la excelente *especificidad* frente patrones moleculares distintos, y la habilidad para recordar antígenos concretos, respondiendo de manera más energética a exposiciones posteriores (*memoria inmunológica*).

² A. A. Abbas, A. H. Lichtman, S. Pillai, *Cellular and Molecular Immunology*, 6th Edition, Elsevier, 2007.

³ D. D. Chaplin, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2003, 111, S442-S459.

⁴ D. D. Chaplin, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2006, 117, S430-S435.

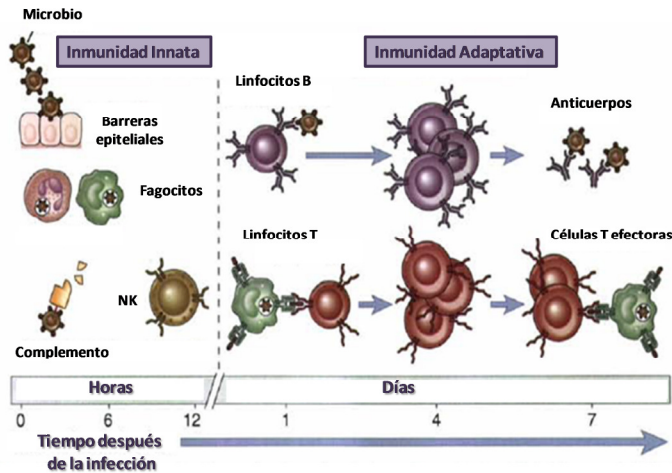


Figura 2. Inmunidad innata y adaptativa. El mecanismo de inmunidad innata proporciona la defensa inicial contra infecciones. Las respuestas inmunes adaptativas se desarrollan más tarde y consisten en la activación de linfocitos, dando dos tipos de respuestas: la respuesta humoral (mediada por células B y anticuerpos) y la respuesta celular (mediada por linfocitos T).

Las respuestas inmunes innatas y adaptativas son componentes de un sistema integrado, encargado de la defensa del individuo huésped, en el cual numerosas células y moléculas están implicadas, funcionando de manera cooperativa.

1.2. Células Especializadas del Sistema Inmunitario

Las respuestas inmunitarias están mediadas por diferentes tipos de células y por las moléculas solubles que éstas secretan (Figura 3).¹

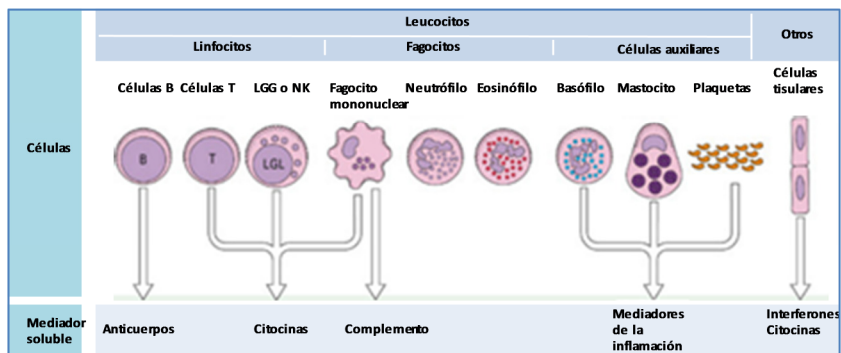


Figura 3. Principales células especializadas del sistema inmunitario y mediadores solubles que producen.

Las células que participan principalmente en las respuestas inmunitarias son los *leucocitos*, entre los que se distinguen diferentes tipos:

1.2.1. Linfocitos

Un grupo importante dentro de los leucocitos son los *linfocitos*. La participación de estas células es esencial en todas las respuestas inmunitarias adaptativas ya que reconocen de forma específica patógenos individuales, independientemente de que éstos se localicen en el interior o en el exterior de las células del huésped, en los líquidos tisulares o en la sangre. Existen varios tipos de linfocitos, cada uno de los cuales desencadena diferentes respuestas inmunes adaptativas:

1.2.1.1. *Células o linfocitos B*: La respuesta inmune mediada por linfocitos B se conoce como respuesta humoral. Cada célula B está programada genéticamente para codificar un único receptor de superficie, específico de un antígeno concreto. Una vez que la célula B reconoce a su antígeno, se multiplica y se diferencia, generando células plasmáticas capaces de producir grandes cantidades de una forma soluble del receptor que puede ser secretada. Estas moléculas se denominan anticuerpos y son grandes glicoproteínas que se encuentran en la sangre y en los líquidos tisulares. Al ser prácticamente idénticas al receptor original, son capaces de unirse al antígeno que activó inicialmente a las células B.

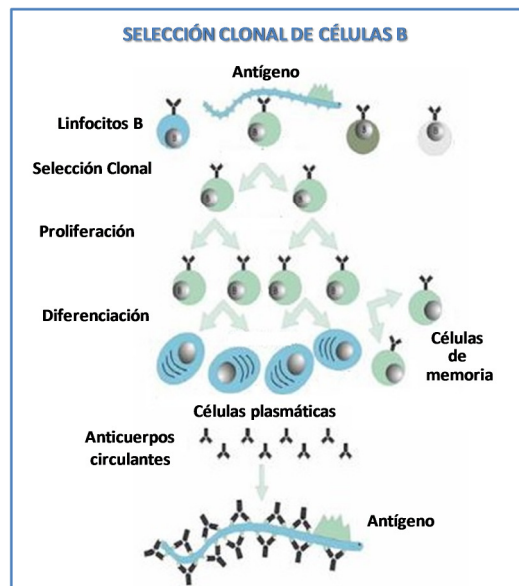


Figura 4. Selección clonal de linfocitos B

Tras la diferenciación celular (*selección clonal*), algunos de los nuevos linfocitos producidos perduran incluso cuando se ha superado la infección, y quedan disponibles para volver a ser estimulados en caso de que se vuelva a producir un nuevo encuentro con el mismo patógeno. Estas células se denominan *células de memoria* y son las responsables de la inmunidad a largo plazo frente a un antígeno determinado.

1.2.1.2. *Células o linfocitos T*: La inmunidad mediada por linfocitos T se conoce como respuesta celular. Hay varios tipos de células T, cada uno de los cuales ejerce diferentes funciones.⁵ Uno de estos grupos está constituido por las células T colaboradoras (T_H , del inglés T-helper). Dentro de éstas, existe un subgrupo (T_H2) que interacciona con las células B promoviendo su multiplicación, diferenciación y la síntesis de anticuerpos. Otro subgrupo (T_H1) activa a los fagocitos mononucleares, ayudándoles a destruir los patógenos intracelulares que han ingerido. Existe un tercer subgrupo (T_H17) que induce la inflamación por estimulación del reclutamiento de leucocitos circulantes (fundamentalmente neutrófilos y monocitos).

Otro tipo de linfocitos T, es el que se encarga de destruir las células del huésped infectadas por virus u otros agentes patógenos intracelulares. Este proceso se denomina citotoxicidad, por lo que estas células T se denominan células T citotóxicas (T_C).

En cualquiera de los casos, para que las células T se activen es necesario que reconozcan a su antígeno, pero sólo son capaces de hacerlo cuando dicho antígeno se presenta en la superficie de otra célula (como por ejemplo, en la de *células presentadoras de antígeno*, APC)⁶ en forma de pequeños fragmentos polipeptídicos (Figura 5). Los fragmentos de antígenos son presentados en la superficie celular por un grupo de moléculas especializadas. Estas moléculas están codificadas en un conjunto de genes denominado complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), por lo que se denominan moléculas MHC. Las células T reconocen a los péptidos antigénicos asociados a estas moléculas MHC mediante sus receptores específicos de antígeno (TCR, de *T-cell receptor*).

⁵ M. T. Esser, R. D. Marchese, L. S. Kierstead, L. G. Tussey, F. Wang, N. Chirmule, M. W. Washabaugh, *Vaccine*, **2003**, 21, 419-430.

⁶ J. Banachereau, R. M. Steinman, *Nature*, **1998**, 392, 245-252.

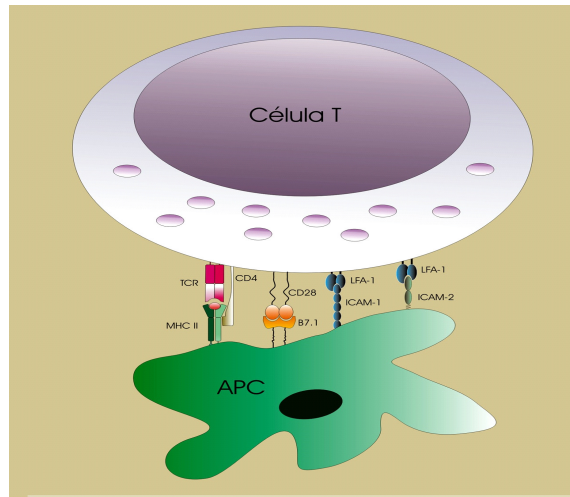


Figura 5. Reconocimiento de antígenos por parte de células T a través de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y otros receptores.

Las células T ejercen sus efectos bien mediante la liberación de proteínas solubles denominadas citocinas y encargadas de la transmisión de señales a otras células, o bien mediante interacciones directas con otras células.

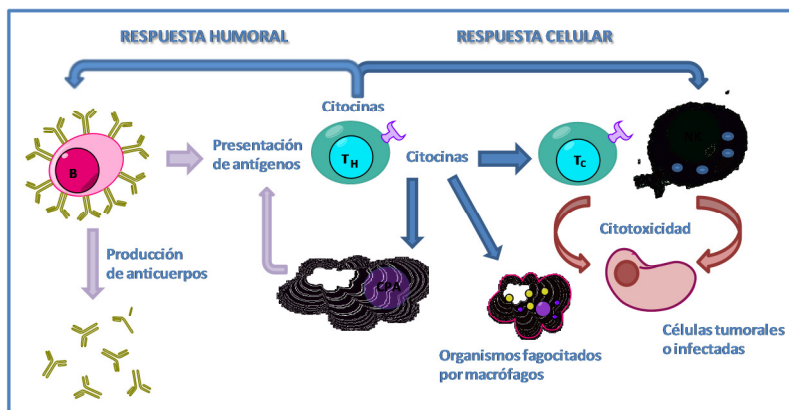


Figura 6. Respuesta humoral y repuesta celular. Interacción entre los diferentes tipos de células implicados en la respuesta inmune, bien mediante liberación de citocinas, bien mediante interacción directa.

1.2.1.3. *Células asesinas o Natural Killer (NK) o Linfocitos Granulosos Grandes (LGG)*: Existe una tercera población de linfocitos que no expresan receptores de antígeno y que se denominan células asesinas naturales (NK). Estas células NK se pueden distinguir funcionalmente de las células B y T, por su capacidad para lisar ciertas líneas celulares sin sensibilización previa.

Morfológicamente, presentan un aspecto de linfocitos granulosos grandes (LGG), por lo que se conocen también con este nombre. Estos linfocitos son capaces de detectar las peculiaridades superficiales de células tumorales o infectadas, eliminándolas incluso si carecen o han perdido sus moléculas MHC, a diferencia de las células T_C. Tanto los macrófagos como los LGG pueden reconocer y destruir antígenos que hayan sido recubiertos previamente por anticuerpos específicos.

1.2.2. Fagocitos

Otro grupo importante de leucocitos son las *células fagocíticas*. Estas células se unen a los microorganismos, los ingieren y los destruyen. Los sistemas de reconocimiento que utilizan son primitivos y carentes de especificidad, lo cual les permiten unirse a una amplia variedad de productos microbianos. Por ello, estos leucocitos son mediadores de respuestas inmunitarias innatas y su misión es formar una primera línea de defensa frente a la infección. Entre estas células podemos encontrar las siguientes:

1.2.2.1. *Fagocitos mononucleares*: Es el grupo más importante de células fagocíticas de larga vida y su misión es reconocer, ingerir y destruir partículas, entre las que se encuentran los agentes infecciosos. Para ello, se encuentran situadas estratégicamente en los lugares en los que tienen mayor posibilidad de capturarlas.

Las células de esta estirpe que circulan en la sangre se denominan *monocitos*. En un momento dado, los monocitos migran hacia los tejidos, donde se transforman en *macrófagos tisulares*. Entre los fagocitos mononucleares encontramos también las *células dendríticas*.

1.2.2.2. *Células dendríticas (DC)*:⁷ este tipo de células son células presentadoras de antígenos (APC). Son también fagocitos mononucleares pero su misión es ingerir, procesar y presentar los antígenos a las células T, así como establecer comunicación con otros leucocitos. Las APC constituyen una población leucocitaria heterogénea con una extraordinaria capacidad inmunoestimulante. Abundan especialmente en la piel, los ganglios linfáticos, el bazo, el seno o debajo de las mucosas y en el timo. Entre ellas, encontramos los siguientes tipos de células:

⁷ D. N. J. Hart, *Blood*, **1997**, 90, 3245-3287.

a) *Células de Langerhans*: Las APC arquetípicas son las *células de Langerhans* de la piel. Estas células, ricas en MHC de clase II, transportan los antígenos procesados, desde la piel y las mucosas a través de las vías linfáticas, hasta los ganglios linfáticos periféricos, donde se encuentran con las células T_H. Durante esta migración, dichas células maduran y pasan a llamarse *células dendríticas interdigitantes*, las cuales presentan el antígeno a los linfocitos T colaboradores.

b) *Células dendríticas foliculares*: Se encuentran en los ganglios linfáticos, en el bazo y en el tejido linfoide asociado a las mucosas. Son también capaces de presentar los antígenos a las células, aunque constituyen una población de células no migratorias. Carecen de moléculas MHC-II, por lo que se unen a los antígenos a través de los receptores de complemento (CD35 y CD21). También expresan receptores para reconocer la región F_C de anticuerpos (*ver más adelante*).

c) *Células dendríticas de centro germinal (GC-DC)*: con MHC-II que, a diferencia de las células dendríticas foliculares son migratorias e interactúan con las células T cuando llegan al centro germinal (interior de un folículo linfoide o ganglio linfático, donde tiene lugar la maduración de linfocitos).

Los *linfocitos B* presentan un alto contenido en moléculas MHC-II (especialmente tras su activación), por lo que son capaces de procesar y presentar antígenos específicos a las células T activadas, con lo cual, aunque forman parte de los linfocitos, también actúan como APC.

1.2.2.3. *Polimorfonucleares neutrófilos*: Se suelen denominar sencillamente neutrófilos o PMN. Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes en la sangre y proceden de los mismos precursores que los monocitos y los macrófagos. Al igual que los monocitos, ante ciertos estímulos migran hacia los tejidos pero a diferencia de ellos, son células de vida corta que ingieren las sustancias extrañas, las destruyen y a continuación, mueren.

1.2.2.4. *Polimorfonucleares eosinófilos (o simplemente eosinófilos)*. Éste es un grupo de leucocitos especializados capaces de atacar y destruir a los grandes parásitos extracelulares. Pertenecen, junto con las células T_C y los

LGG o NK, al grupo de células citotóxicas. Estas células dañan a sus objetivos mediante la liberación en la proximidad de los mismos del contenido de sus gránulos intracelulares u otras moléculas dañinas.

1.2.3. Células auxiliares

Existen otro tipo de *células auxiliares*, que actúan como mediadoras de la inflamación, cuya misión principal es atraer a los leucocitos y a los mediadores solubles de la inmunidad hacia las cercanías del punto de infección.

1.2.3.1. *Basófilos y mastocitos*. Estas células están repletas de gránulos que contienen moléculas promotoras de la inflamación, las cuales son liberadas cuando la célula recibe una señal determinada. También son capaces de sintetizar y secretar ciertos mediadores que controlan el curso de las respuestas inmunitarias. Los mastocitos se encuentran situados en las proximidades de los vasos sanguíneos de todos los tejidos. Sin embargo los basófilos, aunque cumplen funciones parecidas a las de los mastocitos, son células circulantes.

1.2.3.2. *Plaquetas*. Las plaquetas también pueden secretar mediadores de la inflamación cuando son activadas en el proceso de trombogénesis o en presencia de complejos antígeno-anticuerpo.

1.2.3.3. *Células endoteliales*. Expresan moléculas capaces de reconocer a los leucocitos circulantes, con lo que controlan la circulación y distribución de los mismos.

1.3. Mediadores Solubles de la Inmunidad

Todas las células del sistema inmune se comunican entre sí mediante la liberación de mediadores solubles de la inmunidad,¹ encargados de desencadenar respuestas en cascada. Algunos de estos mediadores solubles son los *anticuerpos* o *inmunoglobulinas* (Ig), las *citocinas* (interferones, interleucinas, factores estimuladores de colonias, etc.) y el *sistema del complemento*. La concentración sérica de algunas de estas proteínas aumenta rápidamente en el curso de las infecciones, por lo que se denominan proteínas de fase aguda.

1.3.1. Sistema del complemento

El sistema del complemento consta de unas 20 proteínas séricas que actúan como mediadores de la fagocitosis, controlan la inflamación e interaccionan con los anticuerpos en el proceso de defensa inmunitaria. La activación del complemento es una reacción en cascada en la que cada uno de los componentes actúa secuencialmente sobre el siguiente. Una vez activado el complemento, se liberan péptidos capaces de ejercer las siguientes acciones:

- *Opsonización de microorganismos* para facilitar su captación y destrucción intracelular por parte de los fagocitos. Los componentes del complemento recubren la superficie bacteriana (*opsonización*), gracias a lo cual los fagocitos son capaces de reconocer a las bacterias e ingerirlas.
- *Atracción de los fagocitos hacia los lugares de infección* (quimiotáxis).
- *Aumento del flujo sanguíneo* hacia el lugar en donde se ha producido la activación y aumento de la permeabilidad capilar frente a las moléculas plasmáticas.
- *Introducción de desperfectos en las membranas plasmáticas* de las células, bacterias, virus u otros organismos que hayan provocado la activación. Esto puede conducir a la lisis de la célula o del virus afectado, con la consiguiente reducción de la cantidad de partículas infecciosas.
- *Liberación de más mediadores inflamatorios por parte de los mastocitos*

Estas reacciones pueden ser desencadenadas bien por la capacidad intrínseca del complemento para reconocer algunos componentes microbianos o bien debido a la presencia de anticuerpos unidos a la superficie del microorganismo.

1.3.2. Citocinas

El término *citocina* se aplica a un gran número de moléculas diferentes, cuya misión es transmitir señales entre los linfocitos, los fagocitos y otras células del organismo, en el transcurso de una respuesta inmunitaria. Las citocinas son proteínas o péptidos y algunas tienen unidos azúcares (glicoproteínas). Entre las principales clases de citocinas se encuentran: *interferones* (IFN), *interleucinas* (IL), *factores estimuladores de colonias* (CSF), *factores de necrosis tumoral* (TNF), *factores de crecimiento transformador* (TGF), etc.

1.3.3. Anticuerpos

Los *anticuerpos* (Ab, del inglés *antibodies*), denominados también *inmunoglobulinas* (Ig), son un grupo de moléculas séricas producidas por los linfocitos B. Se trata de las formas solubles de los *receptores de antígeno* de las células B. Todos los anticuerpos presentan la misma estructura básica, pero la región por la que se unen al antígeno es propia de cada uno de ellos. En general, cada anticuerpo se puede unir de forma específica a un único antígeno (Figura 7).

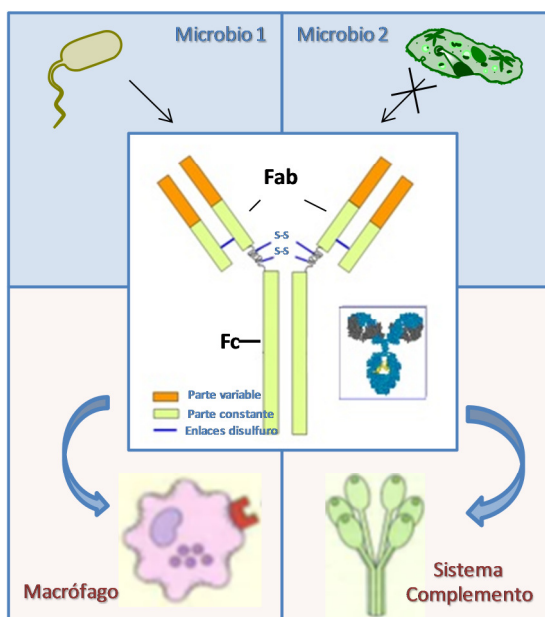


Figura 7. Reconocimiento específico de patógenos por parte de anticuerpos, a través de su *región Fab* (parte variable). Los componentes del sistema inmune, son capaces de reconocer la *región Fc* (parte constante) de anticuerpos y desencadenar respuestas inmunes.

Mientras que una parte de la molécula de anticuerpo se une al antígeno (la *región Fab*, del inglés *fragment antigen binding*), otras regiones interaccionan con diversos elementos del sistema inmunitario, como los fagocitos o algunas de las moléculas del complemento (Figura 7). La región de la molécula de anticuerpo que interacciona con las células del sistema inmunitario se denomina *región Fc*. Los neutrófilos, macrófagos y otros fagocitos mononucleares poseen en su superficie receptores de F_c . Por tanto, si un anticuerpo se une a un patógeno, los fagocitos se pueden unir al mismo mediante sus *receptores Fc*. De esta manera, el patógeno puede ser reconocido, ingerido y destruido en el interior del fagocito. Se dice pues que

el anticuerpo se comporta como una *opsonina* porque induce a la opsonización.

Los anticuerpos no se unen a la partícula completa de agente infeccioso. Según su especificidad, cada uno de los anticuerpos se une solamente a una de las muchas moléculas (*antígenos*) presentes en la superficie del microorganismo. Pueden existir diversos anticuerpos frente a un mismo patógeno, cada uno de los cuales se unirá a un antígeno diferente de la superficie del mismo. Cada anticuerpo se une a una región concreta de la molécula de antígeno que se denomina *epítopo*. Un antígeno concreto puede tener diferentes epítomos o un conjunto de epítomos repetidos (Figura 8).

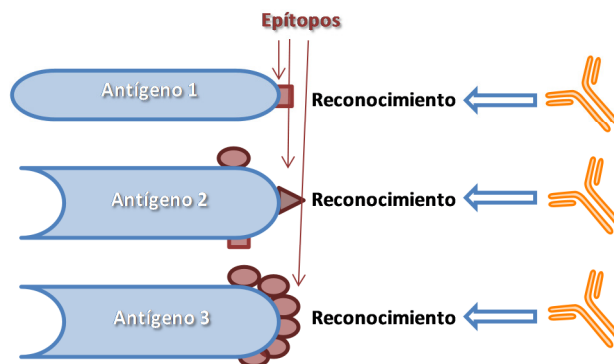


Figura 8. Las moléculas que inducen la producción de anticuerpos se denominan antígenos. Cada molécula de antígeno posee ciertos determinantes antigénicos denominados epítomos. Los epítomos de un antígeno suelen ser distintos a los de otro. Hay antígenos que presentan varios epítomos repetidos y otros que presentan muchos tipos de epítomos diferentes.

Los anticuerpos son específicos de un epítopo, no de la molécula de antígeno completa.

1.4. Células Dendríticas: Entre la Inmunidad Innata y la Inmunidad Adaptativa

1.4.1. Sistema Inmune Innato

La *inmunidad innata* es la respuesta inicial contra microbios y previene, controla o elimina la infección. Este tipo de inmunidad estimula la respuesta inmune adaptativa, influyendo en la naturaleza de la misma y optimizando su efectividad contra diferentes tipos de patógenos. Es decir, la respuesta inmune innata no sólo constituye la primera línea de defensa frente a la infección sino

que también modula el tipo de respuesta inmune adaptativa que se desarrollará a continuación.

Los componentes del sistema inmune innato reconocen moléculas que son comunes en patógenos y que no están presentes en células de mamíferos. Estas moléculas estimulan la inmunidad innata y se denominan *patrones moleculares asociados a patógeno* o PAMPs (del inglés, *pathogen-associated molecular patterns*). Diferentes tipos de agentes microbianos (virus, bacterias gram-negativas, bacterias gram-positivas, hongos, etc.) expresan diferentes PAMPs. Además, estos PAMPs forman parte de estructuras tales como paredes celulares bacterianas, críticas para la supervivencia del patógeno, lo cual hace difícil que los microorganismos las modifiquen por mutación, para sortear al sistema inmune innato.⁸

1.4.2. Células Dendríticas y Receptores de Reconocimiento de Patrones Celulares (PRRs)

Las *células dendríticas* (DCs) juegan un papel fundamental en la inmunidad innata, operando en la interfase entre respuestas inmunes innatas y adaptativas.⁷

Estas células son células estimuladoras de linfocitos B y T muy eficaces. Las células B pueden reconocer directamente a los antígenos mediante receptores expresados en su superficie.^{6,9} Sin embargo, los linfocitos T necesitan una presentación de los mismos previamente procesados, por parte de células presentadoras de antígeno (APCs), tales como las DCs. Los receptores de antígeno de células T (TCRs, del inglés *T-cell antigen receptors*)¹⁰ reconocen fragmentos de antígeno unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), situados en la superficie de las APCs. Estas moléculas pueden ser de dos tipos, MHC tipo I y MHC tipo II, lo cual estimula la diferenciación en células T citotóxicas (T_C) o células T colaboradoras (T_H), respectivamente, modulando la respuesta inmune adaptativa en función del patrón de señalización que tenga lugar.

⁸ J. C. Rassa, S. R. Ross, *Microb. Infect.*, **2003**, 5, 961-968.

⁷ D. N. J. Hart, *Blood*, **1997**, 90, 3245-3287.

⁶ J. Banachereau, R. M. Steinman, *Nature*, **1998**, 392, 245-252.

⁹ R. M. Steinman, *Fundamental Immunology*, 4th Edition, Philadelphia: Lippincott-Raven **1999**.

¹⁰ R. M. Steinman, *Cell*, **2000**, 100, 491-494.

Las células dendríticas se encuentran en sangre y tejidos periféricos en un estado "inmaduro". En este estado no son capaces de activar a las células T, pero tienen una extraordinaria habilidad de capturar antígenos, lo cual conduce a su maduración y migración hacia los nódulos linfáticos (Figura 9).¹¹

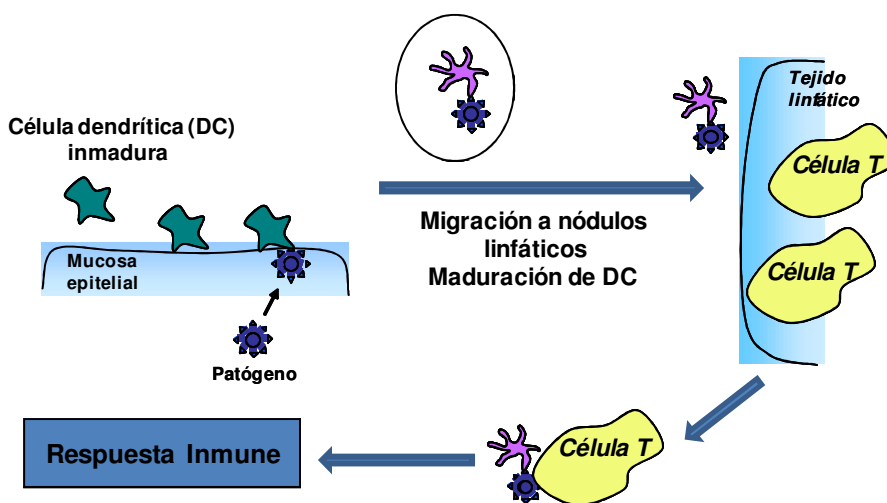


Figura 9. Migración y maduración de células dendríticas tras la activación de las mismas por reconocimiento e internalización de patógenos. Las células dendríticas maduras son capaces de presentar los antígenos a los linfocitos T.

Las DCs maduras estimulan a los linfocitos T, completándose la respuesta inmune mediante la interacción de éstos con otras células, como linfocitos B (formación de anticuerpos), macrófagos (secreción de citocinas), etc.

El reconocimiento de los distintos PAMPs, fundamental para la activación de las células dendríticas, es posible gracias a una serie de receptores que se encuentran tanto en el interior como en la superficie de éstas. Estos receptores, conocidos como PRRs (del inglés, *Pattern Recognition Receptors*), se expresan en numerosos tipos de células y desempeñan dos importantes funciones. Por un lado, producen señales que activan las capacidades antimicrobianas y proinflamatorias de las células en las cuales se expresan. Por otro, facilitan la internalización de patógenos en el interior de las mismas.

¹¹ T. B. H. Geijtenbeek, D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. F. van Duijnhoven, J. Middel, I. L. M. H. A. Cornelissen, H. S. L. M. Nottet, V. N. KewalRamani, D. R. Littman, C. G. Figdor, Y. van Kooyk, *Cell*, **2000**, 100, 587-597.

Entre los diferentes PRRs podemos encontrar los siguientes: receptores de tipo Toll (TLRs), lectinas de tipo C, receptores tipo *scavenger*, NLRs (receptores de tipo Nod), etc.

1.4.3. Receptores de tipo Toll o TLRs

Los TLRs (del inglés, *Toll-like receptors*)^{12,13,14,15,16,17} son una familia de PRRs expresados en muchos tipos de células que juegan un papel fundamental en las respuestas inmunes innatas contra sustancias exógenas. Estos TLRs tienen la habilidad de reconocer patógenos o productos derivados de patógenos e iniciar cascadas de señalización causando la activación de las defensas innatas del huésped. Esto conlleva al reclutamiento de neutrófilos y a la activación de macrófagos, dando lugar a la fagocitosis y eliminación de dichos microorganismos.

Este tipo de receptores están expresados fundamentalmente en macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células epiteliales y células endoteliales.

Al menos nueve TLRs han sido identificados en mamíferos y cada uno de ellos reconoce un único patrón molecular asociado con diferentes clases de patógenos (Figura 10).

¹² S. Gangloff, M. Guenounou, *Clinic. Rev. Allerg. Immunol.*, **2004**, 26, 115-125.

¹³ S. Akira, *Curr. Opin. Immunol.*, **2003**, 15, 5-11.

¹⁴ C. Pasare, R. Medzhitov, *Curr. Opin. Immunol.*, **2003**, 15, 677-682.

¹⁵ S. Akira, *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 38105-38108.

¹⁶ A. M. Krieg, J. Vollmer, *Immunol. Rev.*, **2007**, 220, 251-269.

¹⁷ R. Medzhitov, C. Janeway, Jr., *Immunol. Rev.*, **2000**, 173, 89-97.

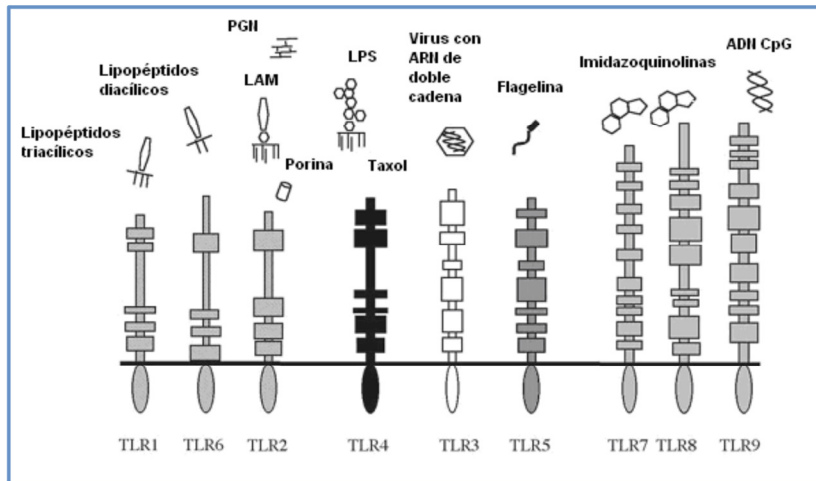


Figura 10. Receptores de tipo Toll (TLRs) y patrones moleculares (PAMPs) que reconocen. (LAM: lipoarabinomanano; PGN: péptidoglicanos; LPS: lipopolisacáridos).

Los TLRs se encuentran en la superficie de las células o en membranas intracelulares, con lo cual son capaces de reconocer patógenos situados en diferentes localizaciones celulares (Figura 11). Los TLRs 3, 7, 8 y 9, se expresan fundamentalmente en el interior de las células, en el retículo endoplasmático (ER) y en membranas endosómicas, donde detectan ácidos nucleicos de patógenos. Sin embargo, los TLRs 1, 2, 4, 5 y 6 se expresan en la superficie de las células. Todos estos receptores reconocen distintos PAMPs, como por ejemplo, lipopolisacáridos de bacterias gram-negativa (TLR4); péptidoglicanos de la cubierta de bacterias gram-positiva (TLR2); motivos CpG no metilados, muy típicos en genomas procariontes y virus ADN (TLR9), y dsARN, producido durante las infecciones virales (TLR3).

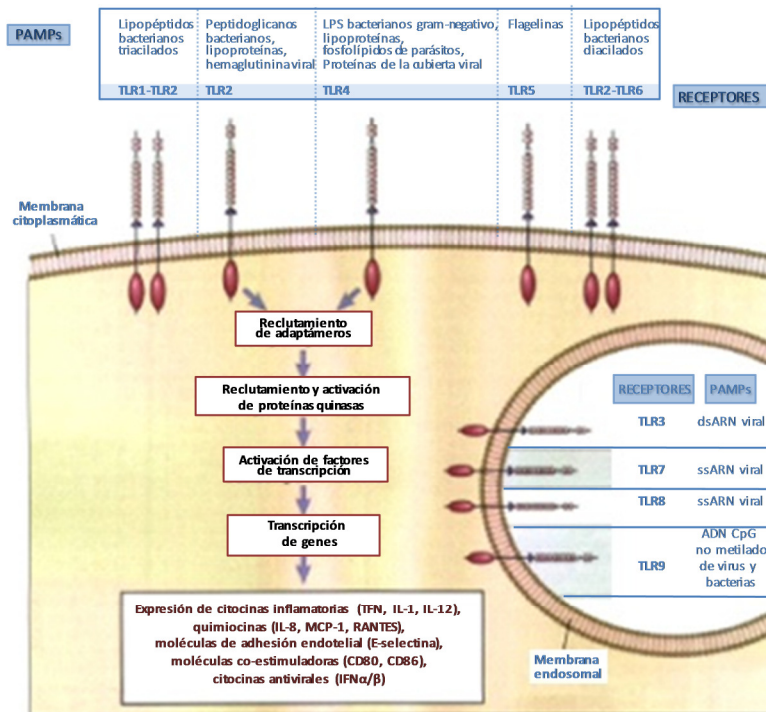


Figura 11. Localización celular de los distintos TLRs y efectos que produce la activación de los mismos.

Además de ser los primeros en detectar y alertar de la invasión de agentes microbianos, los TLRs juegan un papel fundamental en la activación de respuestas inmunes adaptativas. La activación de TLRs, además de inducir expresión de citocinas pro-inflamatorias, conduce a la migración y maduración de DCs, y al aumento en la expresión de moléculas de especial importancia para la respuesta inmune adaptativa, como por ejemplo IL-10, IL-12 y las requeridas para la presentación de antígenos (moléculas MHC-II y moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86).⁸ Como ya se ha comentado anteriormente, las células dendríticas son cruciales en la iniciación de respuestas inmunes adaptativas ya que conducen a la diferenciación de las células T *naïve* (también conocidas como CD4⁺ o T_H0) en diferentes fenotipos de células T efectoras (T_H1, T_H2 o T_H17) o reguladoras (T_{reg}) (Figura 12).

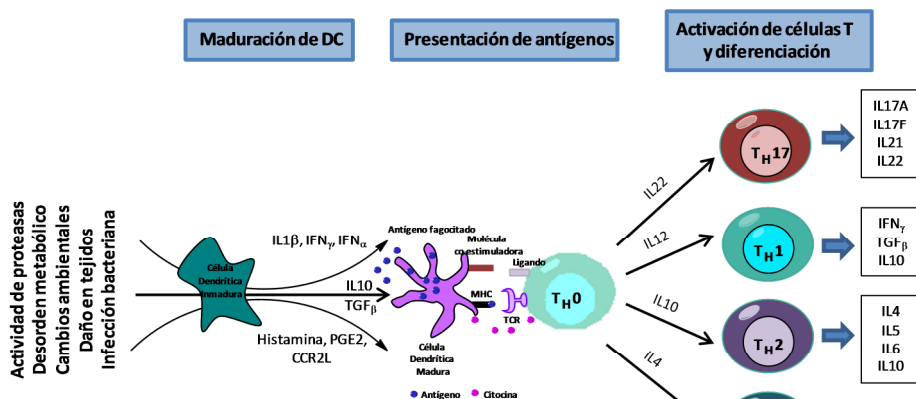


Figura 12. Diferenciación celular de linfocitos T_H naíve (T_H0) en diferentes fenotipos en función del patrón de citocinas promovido por células dendríticas.

Se puede decir pues, que la activación de células del sistema inmune adaptativo está controlada, al menos en parte, por la inducción de moléculas co-estimuladoras y por la producción de ciertas citocinas y quimiocinas por las células del sistema inmune innato, fundamentalmente por células dendríticas (DCs).

Además, los TLRs también están expresados en los linfocitos T y B. Las células T humanas $CD4^+$ expresan una alta variedad de TLRs, siendo TLR1, TLR2, TLR3, TLR5 y TLR9 las formas predominantes. Por tanto, es plausible que los mecanismos de señalización de los TLRs puedan jugar también un papel directo en la activación y diferenciación de células T $CD4^+$, además de los ya conocidos efectos sobre las DCs.¹²

Por tanto, se puede concluir que los TLRs sirven en múltiples funciones: participan en estadios tempranos y tardíos de la respuesta inmune; juegan un papel muy importante en la detección de invasiones de patógenos y otros antígenos exógenos, e instruyen al sistema inmune adaptativo *via* interacciones célula-célula.

1.4.4. Lectinas Tipo C

Las lectinas tipo C (CLRs, del inglés *C-type lectin receptors*) son una importante familia de receptores que interaccionan con carbohidratos presentes en la superficie celular o en productos de secreción de patógenos en procesos de reconocimiento molecular. Esta unión tiene lugar a través de los dominios de reconocimiento de carbohidratos altamente conservados (CRDs,

del inglés *Carbohydrate Recognition Domain*) y es dependiente de calcio (Ca^{2+}).¹⁸ Este tipo de lectinas están expresadas en las membranas citoplasmáticas de macrófagos, células dendríticas y otros leucocitos. También reconocen glicanos expresados por las células del huésped del sistema inmune o de tejidos específicos que, tras dicho reconocimiento, permiten la interacción entre las DCs y otras células inmunes o tisulares.¹⁹

Hay numerosos tipos de lectinas de tipo C con diversas funciones implicadas en varios procesos como por ejemplo, adhesión celular, integración y remodelado de tejidos, activación de plaquetas, activación del complemento, reconocimiento de patógenos, endocitosis y fagocitosis.²⁰

Una forma de clasificar las lectinas de tipo C se basa en la secuencia de aminoácidos implicada en el reconocimiento de azúcares y coordinación del Ca^{2+} . En las lectinas de tipo C que reconocen el carbohidrato manosa, este reconocimiento viene dado por el motivo Glu-Pro-Asn (EPN) de su dominio de reconocimiento. Sin embargo, en lectinas que reconocen galactosa, la secuencia implicada es Gln-Pro-Asp (QPD). Las lectinas de tipo manosa, como el *receptor de manosa* (MR), *DC-SIGN* o *Langerina*, poseen especificidad hacia glicanos con motivos de manosa, fucosa y *N*-acetilglucosamina (GlcNAc). Por el contrario, las lectinas tipo galactosa, como por ejemplo *MGL* (*macrophage galactosamine-type lectin*), reconocen estructuras con galactosa o *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) terminales.¹⁹

Normalmente, la afinidad de las lectinas por monosacáridos monovalentes es muy baja como para desencadenar una respuesta biológica. Por ello, las lectinas de tipo C que funcionan como PPRs contienen múltiples CRDs dentro de una misma molécula o forman *clusters* para permitir el reconocimiento multivalente.

¹⁸ K. Drickamer, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1999**, 9, 585-590.

¹⁹ S. J. van Vliet, J. J. Garcia-Vallejo, Y. van Kooyk, *Immunol Cell Biol*, **2008**, 86, 580-587.

²⁰ A. M. Kerrigan, G. D. Brown, *Immunobiology*, **2009**, 214, 562-575.

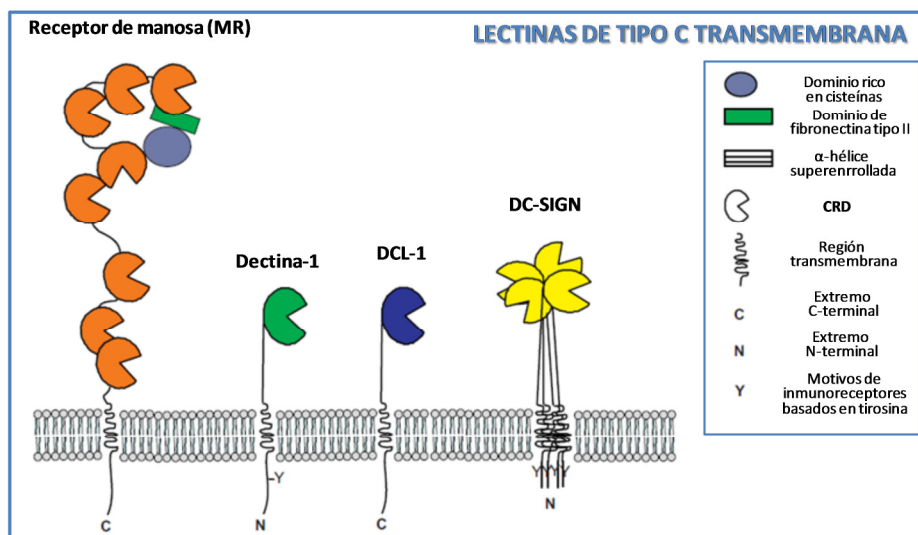


Figura 13. Ejemplos de lectinas de tipo C transmembrana. El receptor de manosa (MR) presenta ocho CRDs, dando lugar a interacciones multivalentes con sus ligandos correspondientes. DC-SIGN, sin embargo, posee un único CRD, consiguiendo interacciones multivalentes mediante la formación de homotetrámeros.

Por ello la naturaleza, existe en muchos casos una presentación multivalente de los carbohidratos (múltiples copias del mismo ligando en las glicoproteínas o glicolípidos)(Figura 14).²¹ Esto hace que dicha afinidad aumente enormemente, incrementándose también la selectividad del proceso, dando lugar a lo que se denomina efecto *cluster* o multivalente.^{22,23,24,25}

²¹ K. J. Doores, Z. Fulton, V. Hong, M. K. Patel, C. N. Scanlan, M. R. Wormald, M. G. Finn, D. R. Burton, I. A. Wilson, B. G. Davis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2010**, *107*, 17107-17112.

²² M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, *37*, 2754-2794.

²³ S. M. Dimick, S. C. Powell, S. A. McMahon, D. N. Moothoo, J. H. Naismith, E. J. Toone, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 10286-10296.

²⁴ J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 555-578.

²⁵ R. J. Pieters, *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*, 2013-2025.

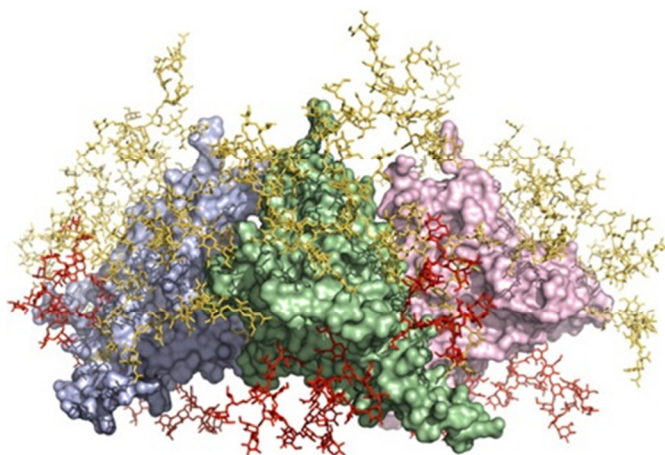


Figura 14. Ejemplo de presentación multivalente en la naturaleza: epítomos de carbohidratos en la glicoproteína *gp120* del VIH. Las cadenas de carbohidratos se encuentran representadas en amarillo. El *clúster* de *high-mannose*, que corresponde con los glicanos unidos a Asn295, Asn332, Asn339, Asn386 y Asn392, están representados en rojo.

La principal función de las CLRs es la internalización de patógenos, lo cual desencadena procesos de señalización y liberación de ciertas citocinas. En presencia de señalización por TLRs, se sobreexpresan moléculas co-estimuladoras y tiene lugar la internalización y presentación mediante CLRs, lo cual inicia la inmunidad a través de estimulación de células T (T_H1 , T_H2 o T_H17). En ausencia de peligro y co-estimulación, la internalización del antígeno a través de CLRs dirige la presentación a células T y el desarrollo de tolerancia mediante células T reguladoras (T_{reg}).¹⁹ Se puede decir, por tanto, que existe una comunicación cruzada entre las respuestas mediadas por CLRs y las mediadas por TLRs, lo cual influye en la activación de células dendríticas y en la respuesta inmune que se desencadena a continuación.²⁶

²⁶ I. Van Die, A. Engering, Y. Van Kooyk, *Trends Glycoscience Glycotechnology*, **2004**, *16*, 265-279.

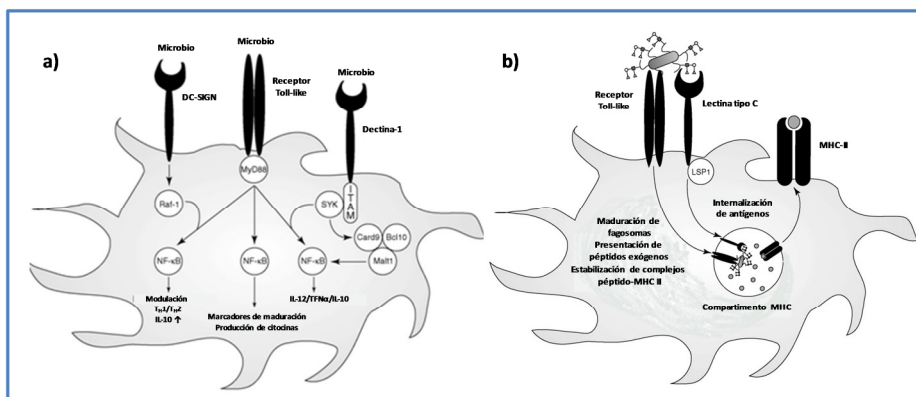


Figura 15. Comunicación entre TLR y CLR en células presentadoras de antígeno.²⁷ a) Los CLRs pueden influir en la señalización mediada por TLR; b) La señalización mediante TLR aumenta la presentación de antígenos endocitados por los CLRs.

Una de las CLRs más estudiadas es la lectina C transmembrana de tipo II, DC-SIGN (*Dendritic-cell specific ICAM-3 grabbing non integrin*, CD209).²⁸ Este receptor está abundantemente expresado en células dendríticas inmaduras e interactúa con glicoproteínas endógenas como ICAM-2 e ICAM-3 (*InterCellular Adhesion Molecules*), presentes en células endoteliales y células T, respectivamente, mediando las interacciones DCs-Células endoteliales y DCs-Células T (Figura 16).^{29,30,31,32}

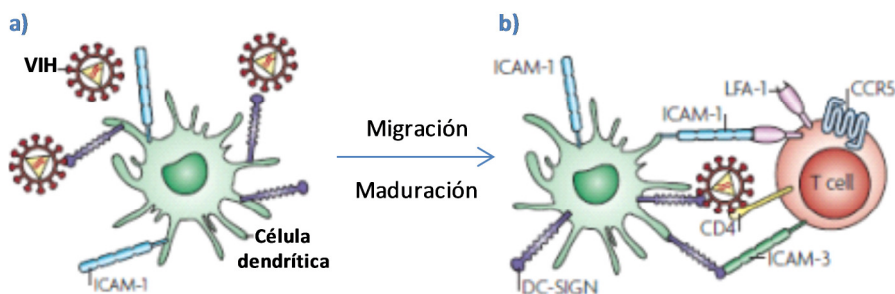


Figura 16. a) Captura del VIH a través de DC-SIGN por reconocimiento de la proteína del virus gp120; b) Transmisión del VIH a linfocitos T.

²⁷ S. J. van Vliet, J. d. Dunnen, S. I. Gringhuis, T. B. H. Geijtenbeek, Y. van Kooyk, *Curr. Opin. Immunol.*, **2007**, 19, 435-440.

²⁸ B. M. Curtis, S. Scharnowske, A. J. Watson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1992**, 89, 8356-8360.

²⁹ T. B. H. Geijtenbeek, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. F. van Duijnhoven, G. J. Adema, Y. van Kooyk, C. G. Figdor, *Cell*, **2000**, 100, 575-585.

³⁰ T. B. Geijtenbeek, D. J. Krooshoop, D. A. Bleijs, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, V. Grabovsky, R. Alon, C. G. Figdor, Y. van Kooyk, *Nat Immunol.*, **2000**, 1, 353-357.

³¹ G. Ferwerda, M. G. Netea, L. A. Joosten, J. W. M. van der Meer, L. Romani, B. J. Kullberg, *Vaccine*, **2010**, 28, 614-622.

³² J. Balzarini, *Nat. Rev. Microbiol.*, **2007**, 5, 583-597.

Esta proteína posee en su extremo *C*-terminal un único CRD que da lugar a interacciones multivalentes con carbohidratos mediante la formación de homotetrámeros.^{33,34} Los oligosacáridos reconocidos por DC-SIGN contienen fundamentalmente unidades de manosa, *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y fucosa.³⁵

En el año 2000, el grupo de la profesora Van Kooyk de la Universidad de Ámsterdam demostró que esta lectina presenta una gran afinidad por glicanos de tipo *high-mannose* (oligosacárido que contiene numerosas unidades de manosa), como los presentes en los sitios de glicosilación de la proteína gp120 del VIH (Figura 17).^{28,29} Tras el proceso de reconocimiento del VIH por DC-SIGN, a través de la interacción con dicha glicoproteína de la envoltura viral, el virus es internalizado en las células dendríticas, las cuales inician una migración hacia los nódulos linfáticos. Una vez llegan a los nódulos linfáticos, las DCs presentan el virus a los linfocitos T CD4+ en un estado completamente infeccioso, lo cual produce la infección de dichas células causando la enfermedad que se conoce como SIDA.

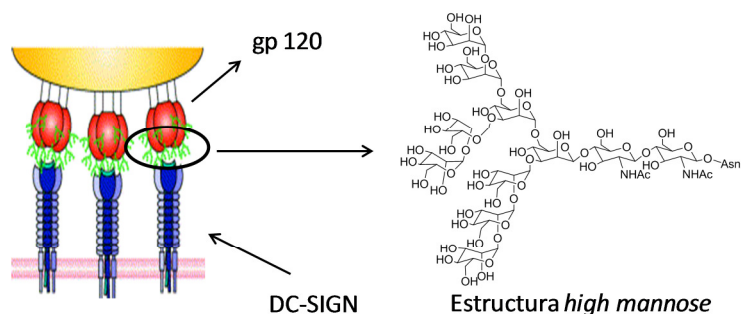


Figura 17. Representación de la interacción multivalente entre DC-SIGN y el oligosacárido *high-mannose* de la proteína gp120.

A partir de este descubrimiento, numerosos grupos de investigación han demostrado que DC-SIGN no sólo participa en el proceso infeccioso del VIH sino que también actúa como receptor de otros muchos patógenos, entre los que cabe destacar bacterias (*Mycobacterium tuberculosis*,³⁶ *Helicobacter*

³³ D. A. Mitchell, A. J. Fadden, K. Drickamer, *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 28939-28945.

³⁴ G. Tabarani, M. Thépaut, D. Stroebel, C. Ebel, C. Vivès, P. Vachette, D. Durand, F. Fieschi, *J. Biol. Chem.*, **2009**, 284, 21229-21240.

³⁵ Y. Guo, H. Feinberg, E. Conroy, D. A. Mitchell, R. Alvarez, O. Blixt, M. E. Taylor, W. I. Weis, K. Drickamer, *Nat Struct Mol Biol*, **2004**, 11, 591-598.

³⁶ T. B. H. Geijtenbeek, S. J. van Vliet, E. A. Koppel, M. Sanchez-Hernandez, C. M. J. E. Vandenbroucke-Grauls, B. Appelmelk, Y. van Kooyk, *J. Exp. Med.*, **2003**, 197, 7-17.

pylori)³⁷, parásitos (*Leishmania infantum*,³⁸ *Schistosoma mansoni*³⁹), otros virus (Ébola,⁴⁰ Dengue⁴¹) y hongos (*Candida albicans* ⁴²).

Por todo esto, los CLR's constituyen, junto con los TLR's, importantes dianas terapéuticas para combatir infecciones. Mientras que los TLR's son fuertes inductores de respuestas inflamatorias, parece que los CLR's tienen el potencial de modular estas respuestas mediante inducción o inhibición de la producción de proteínas. Entender estos mecanismos de defensa frente a la invasión de patógenos ayuda, por tanto, a identificar la diana apropiada para estimular una respuesta inmune adaptativa efectiva y conseguir una protección eficaz, lo cual es fundamental en el desarrollo de nuevas vacunas.³¹

1.5. Sistemas Multivalentes y su Aplicación en Nanomedicina

La nanomedicina,⁴³ considerada como uno de los campos de las nanobiotecnologías con aplicaciones directas en medicina, se puede definir como la ciencia y tecnología empleada en el diseño, preparación y evaluación de sistemas complejos a escala nanométrica, cuyas aplicaciones van desde el transporte de fármacos hasta el desarrollo de vacunas con aplicación en cáncer y procesos infecciosos, incluidos los virales. El desarrollo de la nanotecnología y sus aplicaciones en los últimos años ha aumentado la necesidad de preparar dispositivos moleculares estables, sofisticados y bien definidos a escala nanométrica.⁴⁴

El campo de la nanotecnología ha estado gobernado hasta hace poco por la química de polímeros. A lo largo del tiempo, la complejidad de los polímeros sintéticos ha ido evolucionando derivando desde polímeros lineales hasta

³⁷ M. P. Bergman, A. Engering, H. H. Smits, S. J. van Vliet, A. A. van Bodegraven, H. P. Wirth, M. L. Kapsenberg, C. M. Vandenbroucke-Grauls, Y. van Kooyk, B. J. Appelmelk, *J Exp Med*, **2004**, 200, 979-990.

³⁸ E. Caparrós, D. Serrano, A. Puig-Kröger, L. Riol, F. Lasala, I. Martínez, F. Vidal-Vanaclocha, R. Delgado, J. L. Rodríguez-Fernández, L. Rivas, A. L. Corbí, M. Colmenares, *Immunobiology*, **2005**, 210, 185-193.

³⁹ I. van Die, S. J. van Vliet, A. K. Nyame, R. D. Cummings, C. M. C. Bank, B. Appelmelk, T. B. H. Geijtenbeek, Y. van Kooyk, *Glycobiology*, **2003**, 13, 471-478.

⁴⁰ C. P. Alvarez, F. Lasala, J. Carrillo, O. Muñoz, A. L. Corbí, R. Delgado, *J. Virol.*, **2002**, 76, 6841-6844.

⁴¹ B. Tassaneetrithep, T. H. Burgess, A. Granelli-Piperno, C. Trumfheller, J. Finke, W. Sun, M. A. Eller, K. Pattanapanyasat, S. Sarasombath, D. L. Birx, R. M. Steinman, S. Schlesinger, M. A. Marovich, *J Exp Med*, **2003**, 197, 823-829.

⁴² A. Cambi, K. Gijzen, I. J. M. de Vries, R. Torensma, B. Joosten, G. J. Adema, M. G. Netea, B.-J. Kullberg, L. Romani, C. G. Figdor, *Eur. J. Immunol.*, **2003**, 33, 532-538.

⁴³ S. K. Murthy, *Int J Nanomedicine*, **2007**, 2, 129-141.

⁴⁴ O. Rolland, C.-O. Turrin, A.-M. Caminade, J.-P. Majoral, *New J. Chem.*, **2009**, 33, 1809-1824.

polímeros ramificados e *hyper*-ramificados. Mediante el diseño racional de nuevas metodologías sintéticas ha sido posible el control tanto de la arquitectura del polímero como de su polidispersidad. Este diseño racional en la síntesis, permitió el nacimiento de una clase especial de polímeros hiper-ramificados: *dendrones* y *dendrimeros*.^{45,46} Al contrario que los polímeros tradicionales y debido a su síntesis controlada paso a paso, los dendrones y los dendrimeros son moléculas monodispersas, con estructura molecular bien definida y fácilmente funcionalizables. Una de las principales razones que los hace tan interesantes es su carácter polivalente, considerándose plataformas ideales para la presentación simultánea de múltiples ligandos.^{47,48} Este tipo de presentación de ligandos está siendo muy utilizada en el diseño de fármacos cuyas dianas terapéuticas requieran una interacción polivalente.

Las interacciones polivalentes o tipo *clúster*, como se ha expuesto anteriormente, están caracterizadas por la unión simultánea de ligandos múltiples sobre receptores, también múltiples, tal y como se muestra en la siguiente figura.²²

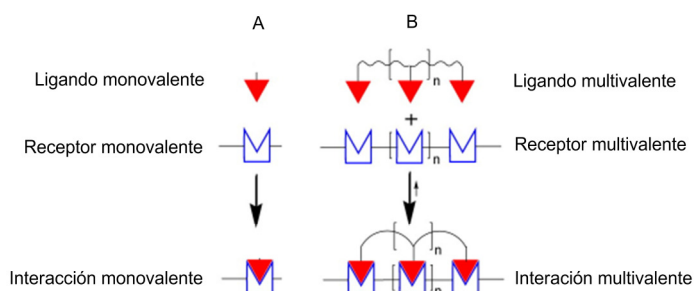


Figura 18. Interacciones mono y multivalentes.

Este tipo de interacciones son muy frecuentes en los procesos biológicos (adhesión de virus y bacterias a superficies celulares, unión de células a moléculas polivalentes -anticuerpos/macrófagos-, unión célula-célula, etc.) y tienen ciertas características que las interacciones monovalentes no poseen. Las interacciones polivalentes son mucho más fuertes y selectivas que las correspondientes a los procesos monovalentes. El hecho de que interacciones múltiples y simultáneas, tengan propiedades colectivas únicas y cualitativamente diferentes a las propiedades de sus constituyentes cuando

⁴⁵ E. Buhleier, W. Wehner, F. Vögtle, *Synthesis*, **1978**, 1978, 155-158.

⁴⁶ G. R. Newkome, Z. Yao, G. R. Baker, V. K. Gupta, *J. Org. Chem.*, **1985**, 50, 2003-2004.

⁴⁷ D. Astruc, E. Boisselier, C. Ornelas, *Chem. Rev.*, **2010**, 110, 1857-1959.

⁴⁸ B. M. Rosen, C. J. Wilson, D. A. Wilson, M. Peterca, M. R. Imam, V. Percec, *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 6275-6540.

interaccionan de forma monovalente, abre las puertas al desarrollo de nuevas estrategias en el diseño de fármacos.

1.5.1. Dendrímeros y Dendrones

Los dendrímeros son macromoléculas poliméricas constituidas por secuencias repetitivas de monómeros, denominados también unidades de ramificación, que se hacen crecer paso a paso desde un núcleo multifuncional de manera iterativa y radial.⁴⁴ Otro tipo de estructura relacionada con los dendrímeros son los dendrones, que se podrían definir como la unidad elemental o "brazo" del dendrímero. Su estructura es esencialmente la misma, excepto porque contienen, en lugar del núcleo de crecimiento, un grupo funcional denominado posición focal (Figura 19).

Dendrones y dendrímeros son moléculas monodispersas, característica crucial para asegurar la reproducibilidad del comportamiento farmacocinético en todas las etapas del descubrimiento y desarrollo de fármacos.^{49,50}

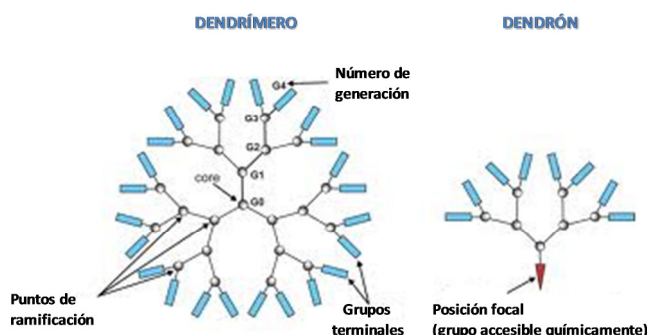


Figura 19. Representación esquemática de la estructura general de dendrones y dendrímeros.

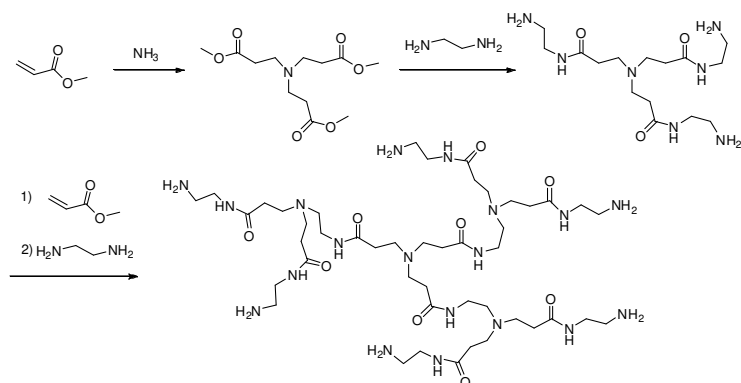
Este tipo de moléculas fue descrito por primera vez por el grupo de Vögtle⁴⁵ en 1978, que desarrolló un método en cascada para obtener aminas de bajo peso molecular. Sin embargo, fue D.A. Tomalia quien puso nombre a estas estructuras, basándose en dos palabras griegas: *dendros*, que significa árbol, y *meros*, que quiere decir parte principal.⁵¹ Su grupo sintetizó la primera familia de dendrímeros, desarrollando una robusta metodología para la producción de

⁴⁹ D. A. Tomalia, *Prog. Polym. Sci.*, **2005**, 30, 294-324.

⁵⁰ A.-M. Caminade, R. Laurent, J.-P. Majoral, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2005**, 57, 2130-2146.

⁵¹ D. A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith, *Polym. J.*, **1985**, 17, 117-132.

los dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM), hoy en día disponibles comercialmente con el nombre de polímeros Starbust®.



Esquema 2. Preparación de dendrímeros de primera y segunda generación desarrollados por el grupo de Tomalia.

Desde su descubrimiento, la investigación en dendrímeros y dendrones ha aumentado de manera exponencial hasta el día de hoy, desarrollándose un elevado número de estructuras diferentes (MAPs,⁵² dendrones basados en poliésteres,⁵³ dendrones poli(propilenimina) (PPI o Astramol®),^{54,55} etc.), así como diversas estrategias sintéticas y aplicaciones.

Los dendrones y dendrímeros se pueden obtener mediante dos aproximaciones sintéticas distintas: la *síntesis divergente* y la *convergente*.⁴⁸

⁵² K. Sadler, J. P. Tam, *Rev. Mol. Biotechnol.*, **2002**, 90, 195-229.

⁵³ C. J. Hawker, J. M. J. Frechet, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 7638-7647.

⁵⁴ C. Wörner, R. Mülhaupt, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1993**, 32, 1306-1308.

⁵⁵ E. M. M. de Brabander-van den Berg, E. W. Meijer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1993**, 32, 1308-1311.

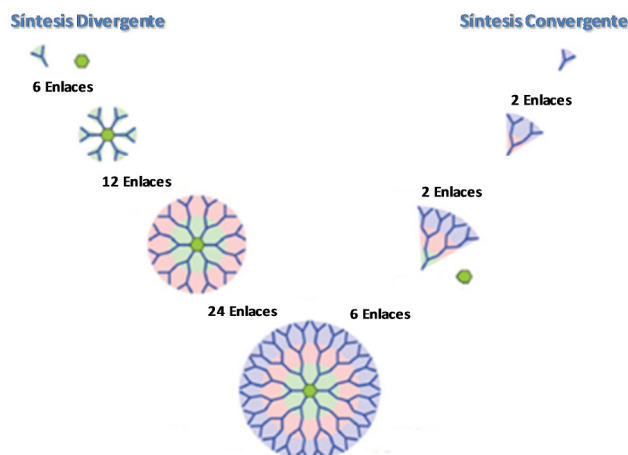


Figura 20. Estrategias divergente y convergente para la síntesis de dendrímeros.

En la *síntesis divergente*, un núcleo ramificado con m puntos de crecimiento ($m = 6$ en la Figura 20), se decora de manera iterativa con unidades de ramificación de tipo AB_n ($n = 2$ en la figura). El número total de enlaces necesarios para dar lugar a una generación g sería igual a $m \times n^{(g-1)}$. Para generaciones pequeñas, los dendrones y dendrímeros sintetizados mediante esta estrategia pueden aislarse como especies monodispersas. Sin embargo, para las generaciones mayores pueden tener lugar ramificaciones incompletas debido al elevado número de enlaces que deben formarse en una única etapa sintética y a impedimentos estéricos, causando cierta polidispersidad.

Por el contrario, en la *estrategia convergente* las unidades periféricas se unen de manera secuencial a unidades de ramificación de tipo AB_n ($n = 2$ en la figura). En cada iteración, el número total de ramificaciones es pequeño e igual a n , y el dendrón o dendrímero resultante puede prepararse de manera monodispersa con reacciones de crecimiento completas. El número total de enlaces que se requieren para obtener un dendrón de generación g mediante esta aproximación son n^g .

Debido al elevado grado de funcionalización periférica, los dendrímeros y los dendrones son excelentes soportes para la presentación multivalente de moléculas de interés terapéutico. En el caso de dendrones, la posición focal se puede dotar también de grupos reactivos que permitan el anclaje de moléculas distintas, confiriendo a estas construcciones un carácter bifuncional potencialmente interesante desde el punto de vista del diseño y desarrollo de fármacos.

De esta manera, se han sintetizado sistemas dendríticos de diferentes ligandos con aplicaciones en el campo de la diagnosis,⁵⁶ como agentes de transferencia génica no viral,^{57,58} como transportadores de fármacos,⁵⁹ etc.

La utilización de carbohidratos como ligandos, da lugar a un tipo de construcciones muy interesantes desde el punto de vista biológico ya que permiten disponer de una presentación multivalente de los mismos, fundamental para poder entender los procesos biológicos en los que están implicados y modularlos. Estos sistemas se conocen con el nombre de *glicodendrimeros*.

1.5.2. Glicodendrimeros

El término *glicodendrimer* se utiliza para describir aquellos dendrimeros que incorporan en su estructura carbohidratos. Los glicodendrimeros pueden clasificarse en tres grupos: los que presentan carbohidratos en su superficie (Figura 21A); los que poseen el carbohidrato como centro de crecimiento (Figura 21B), y los que están constituidos únicamente por carbohidratos (Figura 21C).^{59, 60}

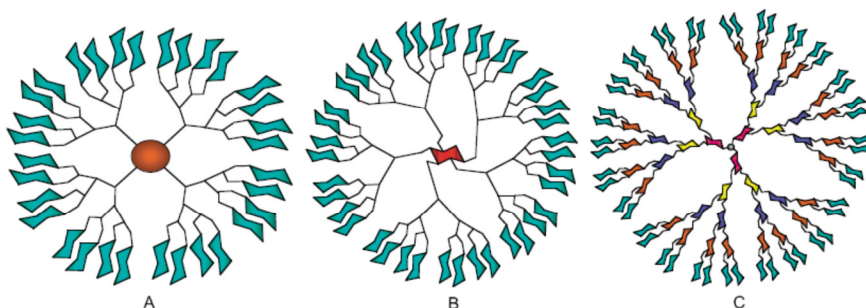


Figura 21. Tipos de glicodendrimeros: A) funcionalizados con carbohidratos sólo en la superficie; B) cuyo centro de crecimiento es un carbohidrato; C) constituidos únicamente por carbohidratos.

Tal y como se ha expuesto anteriormente, la interacción entre carbohidratos y sus receptores presentes en la superficie de la célula o en la matriz extracelular, es esencial para muchos procesos biológicos tales como el

⁵⁶ R. K. Tekade, P. V. Kumar, N. K. Jain, *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 49-87.

⁵⁷ J. Haensler, F. C. Szoka, *Bioconjugate Chem.*, **1993**, 4, 372-379.

⁵⁸ M. X. Tang, C. T. Redemann, F. C. Szoka, *Bioconjugate Chem.*, **1996**, 7, 703-714.

⁵⁹ B. K. Nanjwade, H. M. Bechra, G. K. Derkar, F. V. Manvi, V. K. Nanjwade, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2009**, 38, 185-196.

⁶⁰ R. Roy, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **2003**, 15, 291-310.

reconocimiento patógeno-huésped, la fertilización, la diferenciación, la respuesta inmune, la supervivencia celular, el tráfico, la adhesión, la proliferación y el crecimiento de células cancerígenas, y metástasis.^{61, 62,63,64,65,66,67,68}

Pero como ya se ha comentado, la débil naturaleza de la interacción entre lectinas y su ligando específico,^{64,69,70} hace necesaria una presentación multivalente de los mismos. Está ampliamente documentado que ligandos multivalentes fortalecen las interacciones con sus receptores en comparación con las correspondientes a los carbohidratos monovalentes.⁶⁴ Este efecto *clúster* ha motivado a muchos grupos de investigación a sintetizar una gran variedad de glicoconjugados multivalentes.^{60,71,72,73,74,75,76,77} Sin embargo, son los glicodendrimeros los que han despertado un especial interés debido fundamentalmente, a su monodispersidad y su elevada multivalencia.

El primer glicodendrón descrito, fue preparado por el grupo de Roy y presentaba un esqueleto de polilisinas que contenía múltiples copias de *ácido siálico* (Figura 22). Este glicodendrón se preparó tanto en síntesis en fase sólida como en disolución y era capaz de inhibir la hemoaglutinación promovida por el virus de la gripe, bloqueando el proceso de reconocimiento proteína-carbohidrato.⁷⁸

⁶¹ H.-J. Gabius, H.-C. Siebert, S. André, J. Jiménez-Barbero, H. Rüdiger, *ChemBioChem*, **2004**, *5*, 740-764.

⁶² T. K. Dam, C. F. Brewer, *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 387-430.

⁶³ C. R. Bertozzi, Kiessling, L. L., *Science*, **2001**, *291*, 2357-2364.

⁶⁴ Y. C. Lee, R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.*, **1995**, *28*, 321-327.

⁶⁵ E. Gorelik, U. Galili, A. Raz, *Cancer Metastasis Rev*, **2001**, *20*, 245-277.

⁶⁶ H. Lis, N. Sharon, *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 637-674.

⁶⁷ R. A. Dwek, *Chem. Rev.*, **1996**, *96*, 683-720.

⁶⁸ A. Varki, *Glycobiology*, **1993**, *3*, 97-130.

⁶⁹ E. J. Toone, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1994**, *4*, 719-728.

⁷⁰ B. A. Williams, M. C. Chervenak, E. J. Toone, *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 22907-22911.

⁷¹ E. Kolomiets, M. A. Swiderska, R. U. Kadam, E. M. V. Johansson, K.-E. Jaeger, T. Darbre, J.-L. Reymond, *ChemMedChem*, **2009**, *4*, 562-569.

⁷² E. M. V. Johansson, E. Kolomiets, F. Rosenau, K.-E. Jaeger, T. Darbre, J.-L. Reymond, *New J. Chem.*, **2007**, *31*, 1291-1299.

⁷³ E. Kolomiets, E. M. V. Johansson, O. Renaudet, T. Darbre, J.-L. Reymond, *Org. Lett.*, **2007**, *9*, 1465-1468.

⁷⁴ O. Renaudet, P. Dumy, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, *15*, 3619-3622.

⁷⁵ V. Wittmann, S. Seeberger, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 900-903.

⁷⁶ J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 14922-14933.

⁷⁷ M. Marradi, F. Chiodo, I. Garcia, S. Penades, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 4728-4745.

⁷⁸ R. Roy, D. Zanini, S. J. Meunier, A. Romanowska, *Chem. Commun.*, **1993**, 1869-1872.

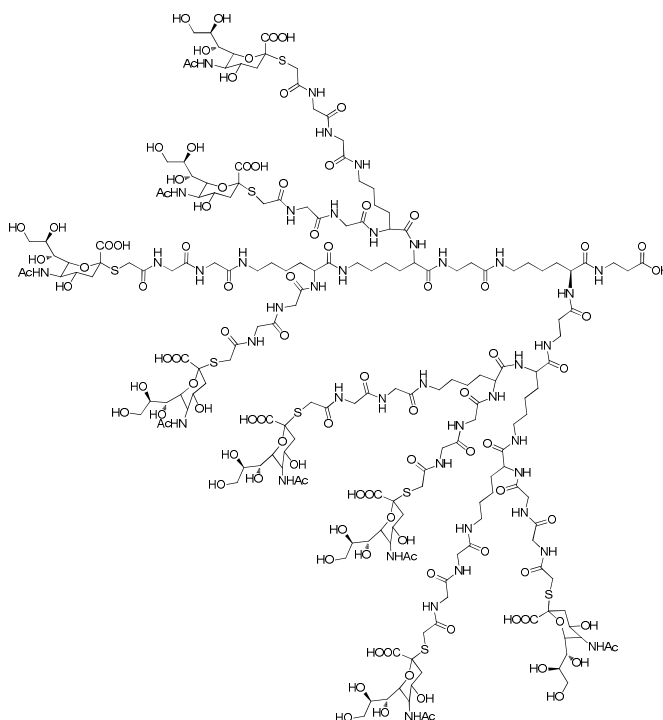


Figura 22. Primer glicodendrón sintetizado por el grupo de Roy.

Este primer ejemplo impulsó la aparición de numerosos trabajos en este campo, demostrando que las estructuras glicodendríticas son unas herramientas muy útiles para obtener información detallada de la interacción carbohidrato-proteína.

Desde entonces, para la construcción de glicodendrimeros se han empleado numerosos tipos de esqueletos, incluyendo algunos disponibles comercialmente como por ejemplo, los derivados del PAMAM (Starburst®)⁵¹ y de la poli(propilenimina) (PPI o Astrapol®).⁵⁵ Ambos poseen una estructura basada en aminas terciarias con aminas primarias en la periferia, lo cual hace que sean fácilmente funcionalizables mediante la formación de enlaces de tipo urea, tiourea o amida. Otros dendrimeros disponibles comercialmente son los basados en poliglicerol y los de tipo Boltorn (Figura 23).

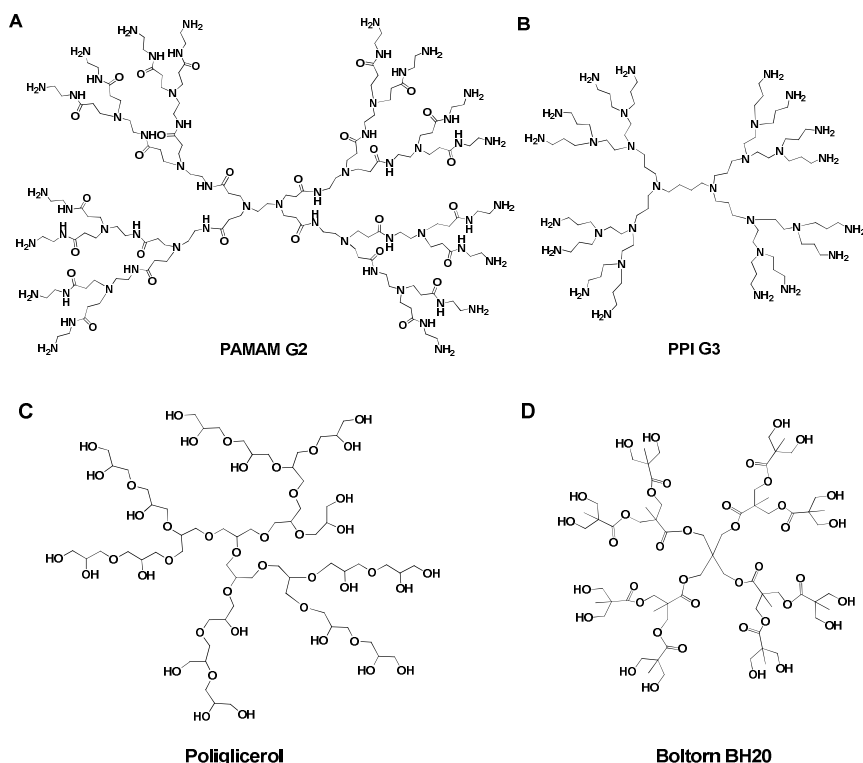


Figura 23. Estructuras de algunos de los soportes dendrímicos disponibles comercialmente.

Para la construcción de glicodendrimeros se han empleado numerosas estrategias sintéticas, basándose en la formación de tioéteres,⁷⁸ carbamatos,^{79,80} el empleo de la aminación reductora,⁸¹ apertura de anillos de lactonas⁸² y las cicloadiciones 1,3-dipolares,⁸³ etc.

La importancia de los glicodendrimeros se pone de manifiesto gracias al gran número de aplicaciones biomédicas que han encontrado. Entre éstas podemos

⁷⁹ P. I. Kitov, J. M. Sadowska, G. Mulvey, G. D. Armstrong, H. Ling, N. S. Pannu, R. J. Read, D. R. Bundle, *Nature*, **2000**, 403, 669-672.

⁸⁰ V. Wittmann, S. Seeberger, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39, 4348-4352.

⁸¹ S. A. Kalovidouris, W. B. Turnbull, J. F. Stoddart, *Can. J. Chem.*, **2002**, 80, 983-991.

⁸² K. Aoi, K. Itoh, M. Okada, *Macromolecules*, **1995**, 28, 5391-5393.

⁸³ F. Pérez-Balderas, M. Ortega-Muñoz, J. Morales-Sanfrutos, F. Hernández-Mateo, F. G. Calvo-Flores, J. A. Calvo-Asín, J. Isac-García, F. Santoyo-González, *Org. Lett.*, **2003**, 5, 1951-1954.

destacar estudios de inhibición de infecciones víricas y bacterianas,^{84,85} erradicación de tumores por estimulación inmune,^{86,87} etc.

En resumen, se puede decir que este tipo de moléculas con una amplia variedad de formas, núcleos, residuos de carbohidrato y valencia, están emergiendo como herramientas especialmente interesantes para el estudio de diferentes procesos de reconocimiento molecular en los que están implicados los carbohidratos.

A pesar de que la síntesis de estructuras dendriméricas ha sido ampliamente estudiada en los últimos años, la falta de una química robusta (fundamental, dado el alto número de ramificaciones a llevar a cabo), ha impedido una completa optimización en la construcción de estas moléculas debido fundamentalmente, a problemas en la purificación. Es aquí, donde el descubrimiento de la *química click* ha jugado un papel relevante.

1.5.3. Química Click

En general, es difícil definir qué tipo de reacciones pueden incluirse dentro del marco de la *química click*, pero se puede definir un objetivo común para esta nueva filosofía química. Este objetivo es desarrollar una amplia variedad de *módulos* selectivos que trabajen de manera fiable a pequeña y gran escala. Para ello se han definido una serie de criterios fundamentales que debe cumplir una reacción para ser estrictamente *click*: fácil de llevar a cabo desde el punto de vista experimental; condiciones simples de reacción (idealmente debe ser un proceso insensible al oxígeno molecular y al agua); productos de partida accesibles; compatible con una amplia variedad de grupos funcionales; posibilidad de llevarse a cabo en ausencia de disolvente o en disolventes no tóxicos (como agua) o fácilmente eliminables; obtención de elevados rendimientos (reacciones cuantitativas), y generar sólo subproductos inofensivos que puedan ser eliminados por métodos no cromatográficos.⁸⁸

⁸⁴ S. C. Buckingham, H. S. Jafri, A. J. Bush, C. M. Carubelli, P. Sheeran, R. D. Hardy, M. G. Ottolini, O. Ramilo, J. P. DeVincenzo, *J. Infect. Dis.*, **2002**, 185, 1222-1228.

⁸⁵ R. D. Kensinger, B. J. Catalone, F. C. Krebs, B. Wigdahl, C.-L. Schengrund, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2004**, 48, 1614-1623.

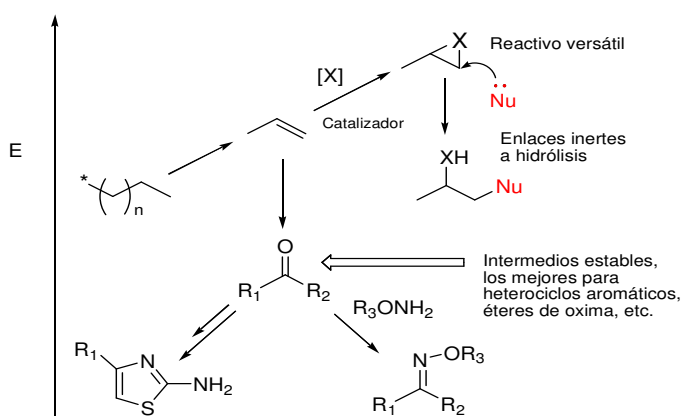
⁸⁶ S. Shaunak, S. Thomas, E. Gianasi, A. Godwin, E. Jones, I. Teo, K. Mireskandari, P. Luthert, R. Duncan, S. Patterson, P. Khaw, S. Brocchini, *Nat Biotechnol.*, **2004**, 22, 977-984.

⁸⁷ L. Vannucci, A. Fiserová, K. Sadalapure, T. K. Lindhorst, M. Kuldová, P. Rossmann, O. Horváth, V. Kren, P. Krist, K. Bezouska, M. Luptovcová, F. Mosca, P. M., *Int. J. Oncol.*, **2003**, 23, 285-296.

⁸⁸ H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 2004-2021.

Si bien existe una gama considerable de reacciones químicas que, en principio, podrían reunir los criterios expuestos anteriormente, los ejemplos más destacados provienen, a menudo, de cuatro grandes clases de reacciones que encajan perfectamente dentro del marco de la *química click*, siendo la mayoría responsables de la formación de enlaces *C-Heteroátomo* (Esquema 3):

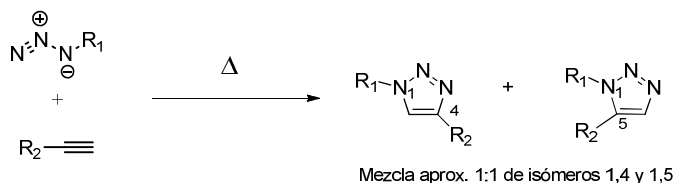
- Reacciones de cicloadición como las 1,3-dipolares o las [4+2] como las Diels-Alder o las hetero Diels-Alder;
- Reacciones de sustitución nucleófila/apertura de anillo, sobre todo, de electrófilos heterocíclicos tales como epóxidos, aziridinas, sulfatos, iones aziridinio e iones episulfonio;
- Reacciones del grupo carbonilo de tipo no aldólica, como la formación de éteres de oxima, hidrazonas y heterociclos aromáticos;
- Reacciones de adición a enlaces múltiples *C-C*, en particular reacciones de oxidación tales como la epoxidación, dihidroxilación, aziridinación y adiciones de haluros de nitrosilo y sulfonilo y adiciones del tipo Michael como las reacciones tíoeno.



Esquema 3. Ejemplos de generación y energías relativas de la formación de compuestos *click*.

Aún así, de entre las muchas reacciones ensayadas, la cicloadición 1,3-dipolar entre azidas y alquinos catalizada por cobre I (*CuAAC*) se ha consolidado como la reacción prototipo dentro de la *química click*, llegando a ser sinónimo de esta nueva filosofía.

Esta reacción de formación de 1,2,3-triazoles, es una mejora de la cicloadición descubierta por Huisgen en los años 70, la cual transcurría de manera térmica en ausencia de catalizador (Esquema 4).



Esquema 4. Reacción de Huisgen: Cicloadición 1,3-dipolar de azidas y alquinos bajo condiciones térmicas. Mecanismo concertado.

Bajo estas condiciones térmicas, se forman los dos posibles regioisómeros (1,4 y 1,5) en una proporción prácticamente equimolar. Sin embargo, en determinadas circunstancias se puede alcanzar un cierto nivel de regioselectividad. De este modo, el uso de acetilenos altamente deficientes en electrones favorece la formación del isómero 1,4, mientras que el uso de azidas deficientes en electrones, favorece la producción del isómero 1,5.

El descubrimiento de Huisgen se constituyó como la ruta más eficiente en la síntesis de este tipo de compuestos heterocíclicos. Una de las principales razones a las que debe su utilidad es la facilidad con la que tanto alquinos como azidas pueden ser introducidos en una molécula, así como la estabilidad relativa de dichos grupos funcionales bajo una amplia variedad de condiciones, lo cual no es común en síntesis orgánica. De hecho, esta estabilidad cinética de alquinos y azidas es responsable de su lenta cicloadición, por lo que la reacción de Huisgen requiere elevadas temperaturas, generalmente condiciones de reflujo en disolventes tales como tolueno o tetracloruro de carbono y periodos de reacción prolongados comprendidos por lo general, entre 12 y 60 horas.

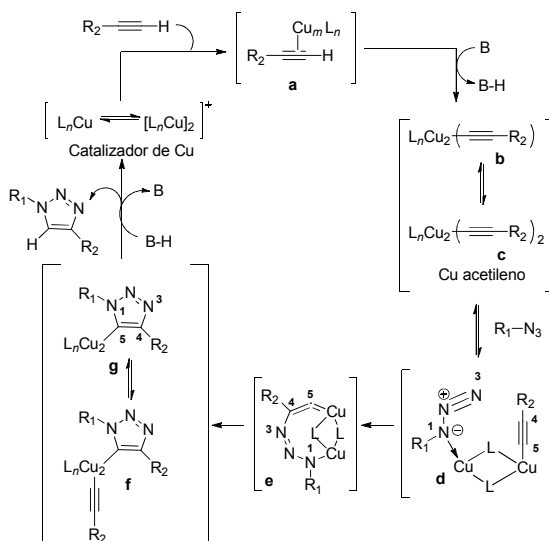
Por todo esto, el gran impacto de la cicloadición 1,3 dipolar entre azidas y alquinos para formar 1,2,3-triazoles tuvo lugar gracias al descubrimiento del proceso catalizado por cobre, mediante el cual no sólo se reducía el tiempo de reacción hasta 10^7 veces⁸⁹ sino que además, daba lugar a una completa regioselectividad, con la formación exclusiva del isómero 1,4. Esta mejora fue desarrollada de manera simultánea e independiente por los grupos de Sharpless y Mendal.

⁸⁹ P. Appukkuttan, W. Dehaen, V. V. Fokin, E. Van der Eycken, *Org. Lett.*, **2004**, 6, 4223-4225.

Mendal y colaboradores emplearon Cu(I) y *N,N*-diisopropilamina (DIPEA) en distintos disolventes, utilizando alquinos inmovilizados en una fase sólida.⁹⁰

El grupo de Sharpless describió el proceso mediante el uso de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y ascorbato sódico en agua para llevar a cabo la cicloadición de alquinos terminales no activados y azidas de tipo alquino/arilo. Es importante señalar, que la posibilidad de llevar a cabo la reacción en agua, proporcionó un gran valor añadido a la misma.⁹¹

En un principio, sólo presentaron actividad alquinos terminales. En base a esto se propuso un mecanismo por pasos,⁹² contrario al mecanismo concertado de la cicloadición vía térmica de Huisgen. Este mecanismo propone que el ciclo catalítico comienza con la formación de especies de Cu^I-acetileno a través del complejo π (cálculos teóricos indican que la coordinación del cobre baja el pK_a del enlace C-H del alquino, por lo que la desprotonación en sistemas acuosos se hace posible incluso sin adición de la base; el complejo Cu-acetileno ha sido encontrado en solución acuosa incluso a pH ácido). La complejación alquino- π es endotérmica, pero la formación de la especie **b** en agua es exotérmica (11.7 kcal/mol), lo cual apoya que este tipo de reacciones aumenten su velocidad en dicho medio (Esquema 5).



Esquema 5. Perfil propuesto para las especies envueltas en el ciclo catalítico.

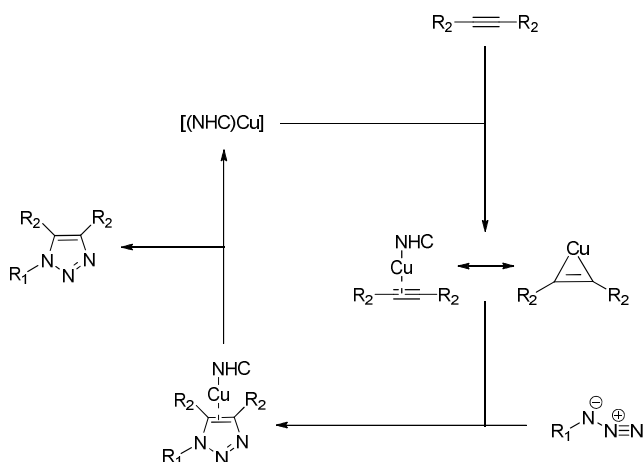
⁹⁰ C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 3057-3064.

⁹¹ V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 2596-2599.

⁹² V. D. Bock, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, 2006, 51-68.

La formación del complejo Cu-acetileno excluye a alquinos internos. Sin embargo, Nolan y colaboradores⁹³ en 2006 llevaron a cabo por primera vez una cicloadición intramolecular [3+2] entre azidas y alquinos internos mediante catálisis por cobre. Demostraron que la síntesis de triazoles 4,5-disustituídos era posible térmicamente, aunque la regioselectividad de esta reacción era algo limitada. Como ligandos de cobre emplearon *N*-heterociclos de carbeno (NHC).

Para alquinos internos no se observó aceleración del proceso en agua, lo cual probablemente podría indicar que el mecanismo de reacción era distinto al de alquinos terminales. Aún así, se pensó que el mecanismo aceptado para alquinos terminales era todavía aplicable para este sistema debido a que los efectos beneficiosos de NHC pueden permitir la activación de alquinos disustituídos para formar un complejo π -alquino (Esquema 6).



Esquema 6. Mecanismo propuesto para la cicloadición de alquinos no terminales.

Es importante señalar que la cicloadición 1,3-dipolar catalizada por Cu (I) posee algunas características muy atractivas desde el punto de vista sintético. El alto grado de fiabilidad, su completa especificidad, la biocompatibilidad y estabilidad química de los grupos reactivos, los protocolos sencillos de purificación y su baja sensibilidad a efectos estéricos, ha hecho de la reacción CuAAC uno de los métodos más robustos para llevar a cabo la unión irreversible de dos bloques moleculares de distinta naturaleza de una forma rápida y fiable. Debido a ello, se han encontrado miles de aplicaciones de esta reacción en síntesis química, ciencia de materiales y biomedicina.

⁹³ S. Díez-González, A. Correa, L. Cavallo, S. P. Nolan, *Chem. Eur. J.*, **2006**, *12*, 7558-7564.

En la bibliografía se pueden encontrar numerosos ejemplos de su utilización en la síntesis de agentes que poseen actividad biológica. Quizá, el principal interés dentro de las aplicaciones biomédicas, reside en la actividad biológica de 1,2,3-triazoles. Las propiedades físico-químicas y biológicas de este bloque estructural hacen de esta arquitectura un excelente mimético del enlace peptídico (Figura 24).

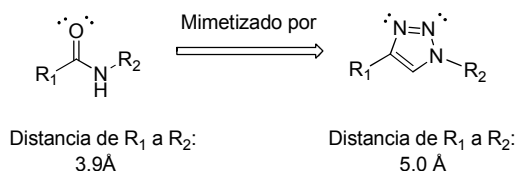


Figura 24. Similitudes topológicas y electrónicas de amidas y 1,2,3-triazoles.

Además, estos heterociclos aromáticos son poco reactivos en medios oxidantes y reductores, a diferencia de otros heterociclos relacionados. Debido en parte a su habilidad para mimetizar ciertos aspectos del enlace peptídico, muchos 1,2,3-triazoles conocidos poseen diversas actividades biológicas,^{92,94} incluyendo anti-VIH,⁹⁵ inhibición selectiva del receptor adrenérgico β_3 ,^{96,97} actividad antibacteriana,⁹⁸ potentes actividades anti-histamínicas,⁹⁹ etc.

Debido, entre otras razones, a su alta selectividad, a que puede transcurrir en medios acuosos y a la simplicidad de introducción de ambos grupos funcionales, la cicloadición 1,3-dipolar catalizada por Cu(I) ha ido también tomando especial importancia en el anclaje de ligandos a moléculas complejas. Además, el hecho de que sea altamente tolerante con los grupos funcionales presentes en proteínas, péptidos y ácidos nucleicos, hacen de esta

⁹⁴ W. S. Horne, M. K. Yadav, C. D. Stout, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 15366-15367.

⁹⁵ R. Alvarez, S. Velazquez, A. San-Felix, S. Aquaro, E. D. Clercq, C.-F. Perno, A. Karlsson, J. Balzarini, M. J. Camarasa, *J. Med. Chem.*, **1994**, *37*, 4185-4194.

⁹⁶ L. L. Brockunier, E. R. Parmee, H. O. Ok, M. R. Candelore, M. A. Cascieri, L. F. Colwell Jr, L. Deng, W. P. Feeney, M. J. Forrest, G. J. Hom, D. E. MacIntyre, L. Tota, M. J. Wyvratt, M. H. Fisher, A. E. Weber, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, *10*, 2111-2114.

⁹⁷ D. R. Buckle, D. J. Outred, C. J. M. Rockell, H. Smith, B. A. Spicer, *J. Med. Chem.*, **1983**, *26*, 251-254.

⁹⁸ M. J. Genin, D. A. Allwine, D. J. Anderson, M. R. Barbachyn, D. E. Emmert, S. A. Garmon, D. R. Graber, K. C. Grega, J. B. Hester, D. K. Hutchinson, J. Morris, R. J. Reischer, C. W. Ford, G. E. Zurenko, J. C. Hamel, R. D. Schaadt, D. Stapert, B. H. Yagi, *J. Med. Chem.*, **2000**, *43*, 953-970.

⁹⁹ K. Sander, T. Kottke, C. Hoffend, M. Walter, L. Weizel, J.-C. Camelin, X. Ligneau, E. H. Schneider, R. Seifert, J.-C. Schwartz, H. Stark, *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 2578-2581.

reacción un método atractivo para la construcción de sistemas biológicos modificados. Así, se han descrito numerosos ejemplos de funcionalización de polímeros,¹⁰⁰ liposomas,¹⁰¹ péptidos,¹⁰² ácidos nucleicos,¹⁰³ así como de proteínas,¹⁰⁴ enzimas,¹⁰⁵ anticuerpos¹⁰⁶ e incluso células completas.^{107,108} También se han llevado a cabo reacciones en ausencia de cobre mediante el uso de *ciclooctinos difluorados* (DIFO),¹⁰⁹ los cuales dan cicloadiciones espontáneas sin necesidad de catalizador, promovidas por la propia tensión del anillo. Este hallazgo supone un gran avance, superando los problemas asociados a la toxicidad del cobre y aportando la posibilidad de desarrollar potentes técnicas de imagen *in vivo*.¹¹⁰

Otra clase de moléculas que se han beneficiado del descubrimiento de la *química click* son los dendrones y dendrímeros. El desarrollo de este tipo de estructuras se ha visto a menudo entorpecido por el empleo de largas rutas sintéticas y por reacciones de rendimiento moderado, que dan lugar a productos con un mayor grado de polidispersidad y de difícil purificación. Por ello, era necesario el desarrollo de metodologías más eficientes que facilitaran su preparación. En este sentido, las reacciones de tipo *click*, y en especial la cicloadición 1,3-dipolar catalizada por Cu(I), han supuesto un punto de inflexión en el desarrollo de construcciones dendríticas.

En el año 2004, el grupo de Sharpless describió por primera vez la preparación de dendrímeros mediante una estrategia convergente y utilizando la reacción *CuAAC*.¹¹¹ En este trabajo, Sharpless describe la preparación de sistemas dendríticos usando monómeros del tipo AB₂, funcionalizados con un cloro en la posición focal y dos grupos alquinos terminales. Al monómero AB₂ se le acoplan distintos grupos R funcionalizados con una azida terminal.

¹⁰⁰ M. Hong, J.-Y. Liu, B.-X. Li, Y.-S. Li, *Macromolecules*, **2011**, *44*, 5659-5665.

¹⁰¹ F. Said Hassane, B. Frisch, F. Schuber, *Bioconjugate Chem.*, **2006**, *17*, 849-854.

¹⁰² K. Gogoi, M. V. Mane, S. S. Kunte, V. A. Kumar, *Nucl. Acids Res.*, **2007**, *35*, e139.

¹⁰³ U. Jakobsen, S. A. Shelke, S. Vogel, S. T. Sigurdsson, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 10424-10428.

¹⁰⁴ O. Boutureira, F. D'Hooge, M. Fernandez-Gonzalez, G. J. L. Bernardes, M. Sanchez-Navarro, J. R. Koepppe, B. G. Davis, *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 8142-8144.

¹⁰⁵ J. L. Brennan, N. S. Hatzakis, T. R. Tshikhudo, V. Razumas, S. Patkar, J. Vind, A. Svendsen, R. J. M. Nolte, A. E. Rowan, M. Brust, *Bioconjugate Chem.*, **2006**, *17*, 1373-1375.

¹⁰⁶ M. M. J. Kamphuis, A. P. R. Johnston, G. K. Such, H. H. Dam, R. A. Evans, A. M. Scott, E. C. Nice, J. K. Heath, F. Caruso, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 15881-15883.

¹⁰⁷ A. J. Link, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 11164-11165.

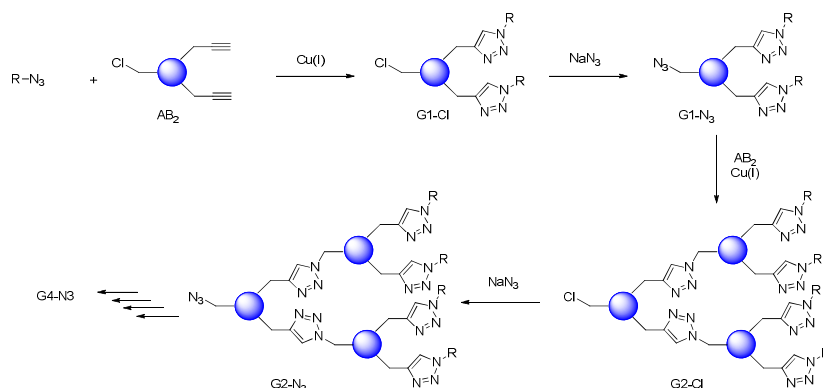
¹⁰⁸ V. Hong, N. F. Steinmetz, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconjugate Chem.*, **2010**, *21*, 1912-1916.

¹⁰⁹ N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 15046-15047.

¹¹⁰ S. T. Laughlin, J. M. Baskin, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *Science*, **2008**, *320*, 664-667.

¹¹¹ P. Wu, A. K. Feldman, A. K. Nugent, C. J. Hawker, A. Scheel, B. Voit, J. Pyun, J. M. J. Fréchet, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 3928-3932.

Como catalizador, se emplea $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en presencia de ascorbato sódico, para reducir *in situ* el Cu(II) a Cu(I). Posteriormente, el cloro de la posición focal se sustituye por un grupo azida y éste se hace reaccionar con el monómero inical AB_2 . Mediante repetición de estos pasos, llegaron hasta la cuarta generación (G4).



Esquema 7. Síntesis convergente de sistemas dendríticos utilizando la reacción de cicloadición 1,3-dipolar catalizada por Cu(I).

La metodología utilizada resultó tan eficiente que se empleó solamente un equivalente del derivado de azida por grupo alquino, obteniéndose buenos rendimientos. Este hecho, permitió que no fuera necesaria la purificación mediante cromatografía en gel de sílice, empleándose una elaboración sencilla basada en extracciones.

Desde este descubrimiento, numerosos ejemplos se han descrito en la bibliografía,^{112,113,114,115} lo cual demuestra la importancia y el impacto de dicha metodología en la síntesis y desarrollo de sistemas multivalentes.

Un ejemplo a destacar es la construcción de sistemas glicodendríticos mediante el uso de carbohidratos desprotegidos. En la bibliografía se pueden encontrar numerosos ejemplos del uso de la *química click* en la síntesis de glicodendrones a través de carbohidratos protegidos.^{112,113,116,117,118,119,120} Sin

¹¹² M. Touaibia, A. Wellens, T. C. Shiao, Q. Wang, S. Sirois, J. Bouckaert, R. Roy, *ChemMedChem*, **2007**, 2, 1190-1201.

¹¹³ E. Fernandez-Megia, J. Correa, I. Rodríguez-Meizoso, R. Riguera, *Macromolecules*, **2006**, 39, 2113-2120.

¹¹⁴ M. Malkoch, K. Schleicher, E. Drockenmuller, C. J. Hawker, T. P. Russell, P. Wu, V. V. Fokin, *Macromolecules*, **2005**, 38, 3663-3678.

¹¹⁵ M. J. Joralemon, R. K. O'Reilly, J. B. Matson, A. K. Nugent, C. J. Hawker, K. L. Wooley, *Macromolecules*, **2005**, 38, 5436-5443.

¹¹⁶ M. Touaibia, R. Roy, *Mini Rev. Med. Chem.*, **2007**, 7, 1270-1283.

¹¹⁷ M. P. Leal, M. Assali, I. Fernández, N. Khiar, *Chem. Eur. J.*, **2011**, 17, 1828-1836.

embargo, para poder trasladar estas condiciones a la preparación de sistemas multivalentes de carbohidratos de interés biológico más complejos, es necesario evitar en la medida de lo posible procesos de protección/desprotección. Es por ello que el empleo de la CuAAC en nuevas metodologías que implican azúcares desprotegidos,¹²¹ ha potenciado la aplicabilidad de los glicodendrimeros en el desarrollo de construcciones multivalentes de ligandos con interesantes aplicaciones en biomedicina.

¹¹⁸ S. G. Gouin, J. M. García Fernández, E. Vanquelef, F.-Y. Dupradeau, E. Salomonsson, H. Leffler, M. Ortega-Muñoz, U. J. Nilsson, J. Kovensky, *ChemBioChem*, **2010**, *11*, 1430-1442.

¹¹⁹ S. G. Gouin, E. Vanquelef, J. M. García Fernández, C. Ortiz Mellet, F.-Y. Dupradeau, J. Kovensky, *J. Org. Chem.*, **2007**, *72*, 9032-9045.

¹²⁰ E. Galante, C. Geraci, S. Sciuto, V. L. Campo, I. Carvalho, R. Sesti-Costa, P. M. M. Guedes, J. S. Silva, L. Hill, S. A. Nepogodiev, R. A. Field, *Tetrahedron*, **2011**, *67*, 5902-5912.

¹²¹ C. Wendeln, A. Heile, H. F. Arlinghaus, B. J. Ravoo, *Langmuir*, **2010**, *26*, 4933-4940.

Capítulo

2

*Antecedentes
y Objetivos*

2. Antecedentes y Objetivos

2.1. Antecedentes

En los últimos años nuestro grupo de investigación se ha centrado en el diseño y síntesis de diferentes compuestos multivalentes de carbohidratos como posibles inhibidores de la lectina DC-SIGN, bloqueando de esta manera el proceso de infección viral en distintos modelos celulares,^{122,123,124,125} o como interesantes vectores para internalizar en células diana biomoléculas de interés terapéutico como péptidos u oligonucleótidos, abriendo la puerta a su posible uso en el desarrollo de vacunas.¹²⁶

Como soporte para esta presentación multivalente de carbohidratos, se han empleado dendrímeros y dendrones convenientemente funcionalizados para poder anclar en su superficie numerosas copias de los carbohidratos seleccionados.

Como primera aproximación, se diseñó una metodología divergente para la síntesis de glicodendrimeros a través de moléculas simples y accesibles.^{122,123,124,125,127} Para ello se seleccionó como plataforma el polímero dendrítico hiperramificado Boltorn, comercialmente disponible, y manosa como ligando de DC-SIGN. Estos polímeros hiperramificados se construyeron utilizando el ácido bis-hidroximetilpropiónico (bis-MPA) como bloque de construcción y pentaeritritol como núcleo. Los glicodendrimeros se prepararon utilizando la segunda (BH20) y la tercera generación (BH30) de polímeros Boltorn, conjugándolos con 16 y 32 unidades de manosa, respectivamente (Figura 25).

¹²² J. Rojo, R. Delgado, *J. Antimicrob. Chemother.*, **2004**, *54*, 579-581.

¹²³ S. Sattin, A. Daggetti, M. Thépaut, A. Berzi, M. Sánchez-Navarro, G. Tabarani, J. Rojo, F. Fieschi, M. Clerici, A. Bernardi, *ACS Chem. Biol.*, **2010**, *5*, 301-312.

¹²⁴ G. Tabarani, J. J. Reina, C. Ebel, C. Vivès, H. Lortat-Jacob, J. Rojo, F. Fieschi, *FEBS Letters*, **2006**, *580*, 2402-2408.

¹²⁵ F. Lasala, E. Arce, J. R. Otero, J. Rojo, R. Delgado, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2003**, *47*, 3970-3972.

¹²⁶ M. O. Sanchez-Maldonado, *Glicodendrones como plataformas multivalentes para la transferencia selectiva de moléculas de interés biológico. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, Sevilla*, **2010**.

¹²⁷ E. Arce, P. M. Nieto, V. Díaz, R. G. Castro, A. Bernad, J. Rojo, *Bioconjugate Chem.*, **2003**, *14*, 817-823.

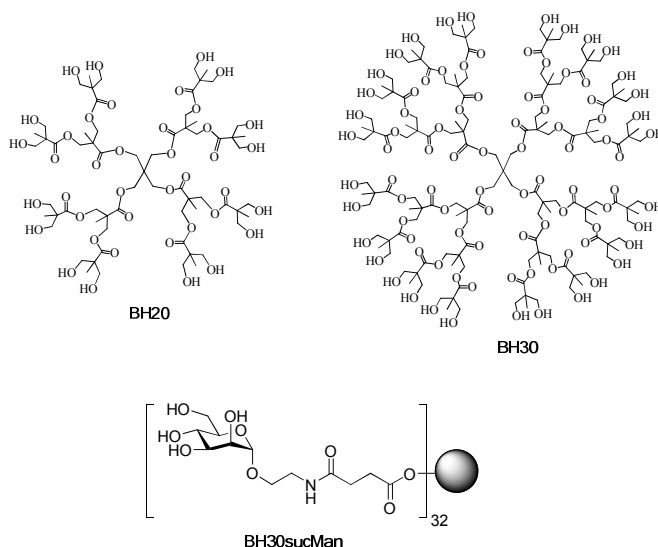
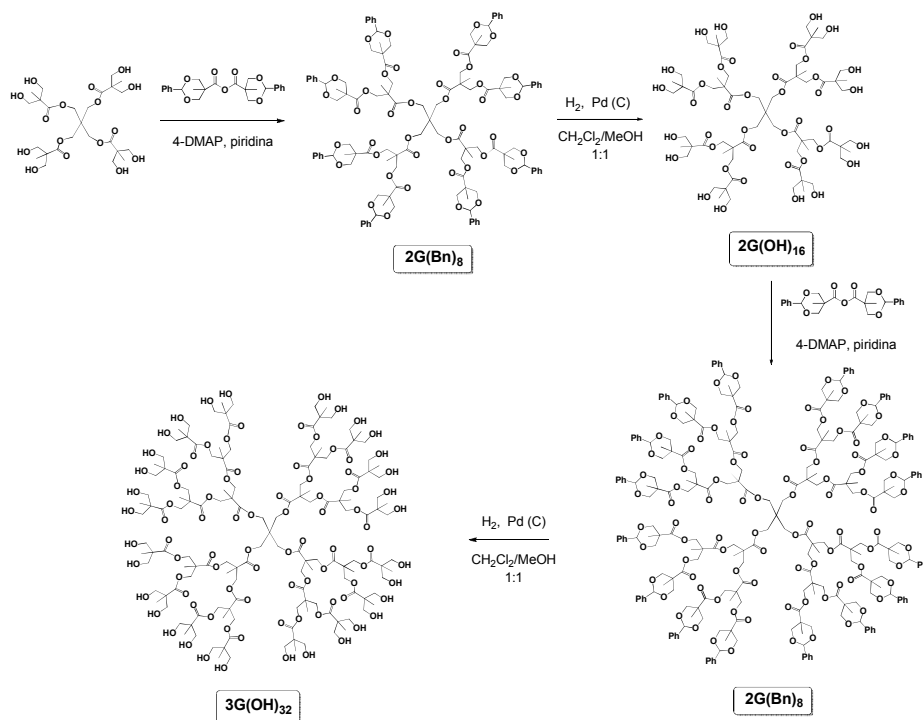


Figura 25. Estructuras tipo Boltorn hiperramificadas de segunda (BH20) y tercera (BH30) generación y del glicodendrímtero BH30sucMan (32 unidades de manosa).

Se demostró que estas estructuras eran perfectamente solubles en medios fisiológicos, inocuas para diferentes líneas celulares y fácilmente sintetizables. Además, se analizaron sus propiedades biológicas en varios modelos de infección, demostrándose su elevada actividad antiviral. Mediante el uso de biosensores con detección por resonancia del plasmón de superficie (SPR), se demostró su habilidad de inhibir la interacción gp120/DC-SIGN, encontrándose un IC_{50} para el compuesto BH30sucMan de 50 μM .¹²⁴ Adicionalmente, se estudiaron las propiedades antivirales de BH30sucMan empleando un modelo de infección del virus del Ébola. Este glicodendrímtero, inhibía la infección del Ébola mediada por DC-SIGN, tanto en *cis* como en *trans*, encontrándose un IC_{50} de 0.3 μM .¹²⁵

A pesar de estos prometedores resultados, el problema asociado al uso de estas estructuras tipo Boltorn comerciales es su polidispersidad, no pudiéndose controlar la síntesis de glicodendrímteros y la reproducibilidad de los ensayos biológicos por la presencia de mezcla de compuestos. Por ello, se procedió a preparar los sistemas dendríticos de tipo Boltorn paso a paso y de manera divergente, evitando estos potenciales problemas mediante el control de su síntesis y dando lugar a sistemas monodispersos (Esquema 8).¹²⁸

¹²⁸ J. J. Reina-Martin, *Diseño y síntesis de ligandos basados en carbohidratos y estudio de la interacción con la lectina DC-SIGN*, Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, Sevilla, 2008.



Esquema 8. Síntesis divergente del dendrímero de 3ª Generación $3G(OH)_{32}$ monodisperso.

Para funcionalizar este dendrímero Boltorn de tercera generación, en primer lugar se empleó anhídrido succínico para dar lugar al derivado provisto de ácidos carboxílicos en su superficie y en segundo lugar, se utilizaron ligandos con mayor afinidad por el receptor DC-SIGN que el derivado de manosa para dar lugar a los glicodendrímeros correspondientes a través de la formación de un enlace amida. Los ligandos comentados son los recogidos en la figura 26: el pseudodisacárido $Man\alpha(1,2)pseudoMan$ y el pseudotrisacárido $Man\alpha(1,2)pseudoMan\alpha(1,6)Man$.

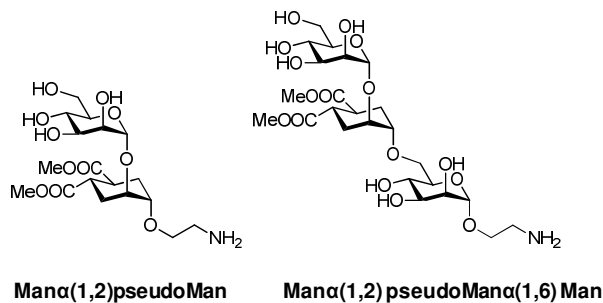


Figura 26. Pseudo-disacárido $Man\alpha(1,2)pseudoMan$ y pseudo-trisacárido $Man\alpha(1,2)pseudoMan\alpha(1,6)Man$.

Para obtener los correspondientes sistemas multivalentes se utilizaron tanto el dendrímero tipo Boltorn monodisperso $3G(OH)_{32}$, como un dendrón tetravalente obtenido también mediante una estrategia divergente (Figura 27).

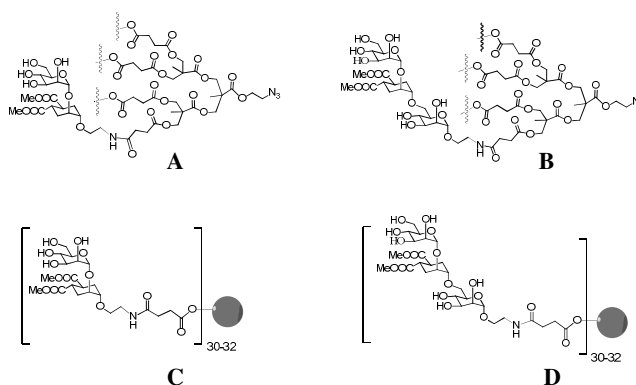


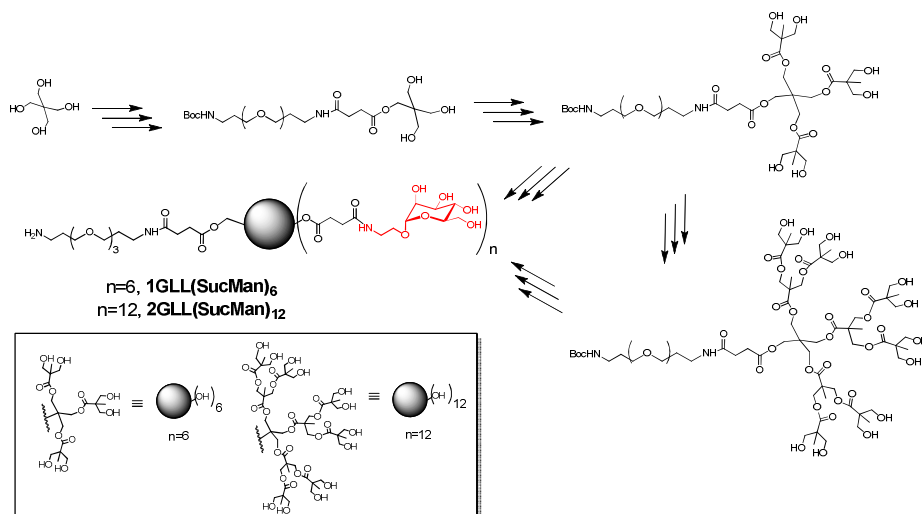
Figura 27. Estructura de glicodendrones tetravalentes **A** y **B** y de los glicodendrimeros **C** y **D**.

Estos glicodendrones y glicodendrimeros se evaluaron como potenciales inhibidores de DC-SIGN, encontrándose que los sistemas tetravalentes **A** y **B** presentaban actividad en el orden micromolar y que los dendrímeros **C** y **D** mostraban un fuerte efecto de inhibición con un IC_{50} en el orden nanomolar.¹²⁹

Este tipo de estrategias divergentes se emplearon también para la construcción de glicodendrones de diferente valencia provistos de grupos reactivos en sus posiciones focales, permitiendo de esta manera la bioconjugación de moléculas de interés biológico como péptidos y ácidos nucleicos.

La síntesis de estos glicodendrones se basó de nuevo en el bis-MPA como unidad de crecimiento y en el pentaeritritol como núcleo, tal y como se muestra en el siguiente esquema.¹²⁶

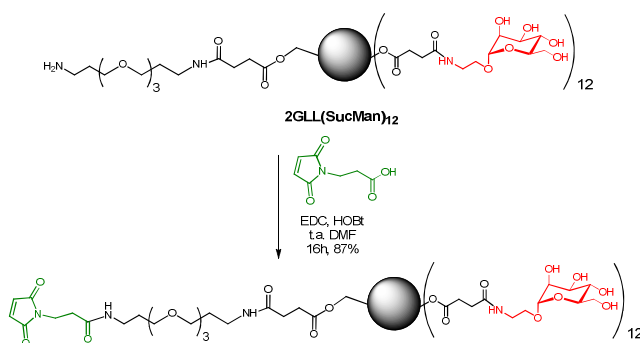
¹²⁹ J. Luczkowiak, S. Sattin, I. Sutkevičiūtė, J. J. Reina, M. Sánchez-Navarro, M. Thépaut, L. Martínez-Prats, A. Daggetti, F. Fieschi, R. Delgado, A. Bernardi, J. Rojo, *Bioconjugate Chem.*, **2011**, 22, 1354-1365.



Esquema 9. Síntesis divergente de glicodendrones de primera (1GLL(SucMan)₆) y segunda generación (2GLL(SucMan)₁₂) apropiadamente funcionalizados.

En concreto, el glicodendrón 2GLL(SucMan)₁₂ demostró capacidad para bloquear la interacción entre el receptor DC-SIGN y la glicoproteína BSA-Man, lo cual hizo de este compuesto un sistema interesante para la conjugación de biomoléculas como vector de internalización en células diana.

Para ello, sobre este glicodendrón se ancló el ácido 3-maleimido propiónico a través de la formación de un enlace amida (Esquema 10), lo cual permitiría la conjugación de biomoléculas provistas de un grupo tiol *via* adición de Michael.



Esquema 10. Síntesis del 2GLL(SucMan)₁₂ provisto de un grupo maleimida. Este compuesto permite de manera sencilla la bioconjugación de moléculas de interés terapéutico.

Así por ejemplo, utilizando este compuesto se obtuvo el glicoconjugado que se muestra en la figura 28, mediante la reacción del grupo tiol de la cisteína

terminal del péptido RGDGGSGGSC con el grupo maleimida de la posición focal.

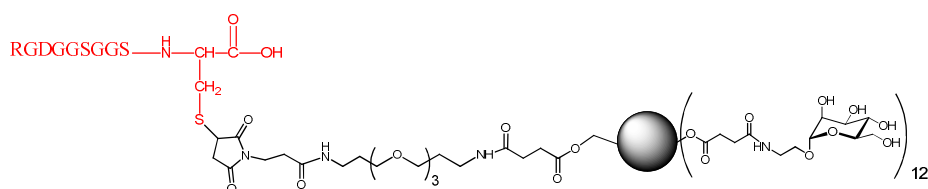


Figura 28. Glicoconjugado con un péptido de secuencia RGDGGSGGSC.

Aún así, a pesar de estos antecedentes, la síntesis divergente de glicodendrones y glicodendrimeros presenta ciertas desventajas. El principal problema es la formación simultánea de múltiples enlaces en un único paso, lo cual genera defectos estructurales debido a conjugaciones incompletas. De esta manera se llega a mezclas de compuestos de estructura y propiedades similares, lo cual dificulta la purificación y en consecuencia, la obtención de sistemas monodispersos.

Es por ello que nuestro grupo de investigación decidió poner a punto estrategias convergentes que permitiesen llegar a sistemas multivalentes de una manera eficiente, con control total de la reactividad y a partir de bloques de construcción relativamente sencillos. Para el acoplamiento entre el núcleo y las unidades de crecimiento, se eligió la cicloadición 1,3-dipolar tipo Huisgen catalizada por Cu^{I} entre azidas y alquinos (CuAAC). Con este fin, se sintetizaron los dos núcleos representados en la figura 29, funcionalizados con grupos alquino en sus puntos de ramificación (núcleos E y F).¹³⁰

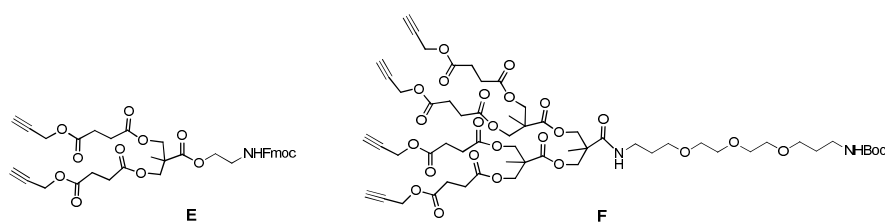


Figura 29. Núcleos preparados para la síntesis convergente de glicodendrones.

Como unidad de carbohidrato se eligió un glicodendrón tetravalente de manosa, sintetizado a partir de bis-MPA (**G**, Figura 30). Este glicodendrón, estaba provisto de un grupo azida en su posición focal que le permitiría reaccionar con los grupos alquino de los núcleos de crecimiento (**E** y **F**).

¹³⁰ M. Sánchez-Navarro, *Síntesis de sistemas multivalentes de carbohidratos basados en glicodendrones*, Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, Sevilla, **2009**.

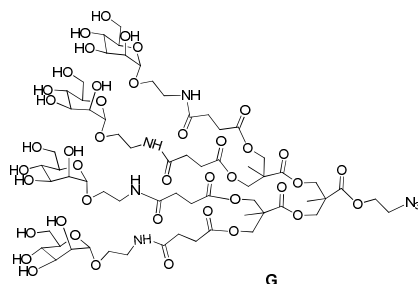


Figura 30. Glicodendrón tetravalente **G** con un grupo azida en su posición focal.

De esta manera se prepararon los sistemas octa- y hexadecavalentes (Figura 31, compuestos **H** e **I**), utilizando como fuente de cobre CuI y TBTA en *t*BuOH/H₂O. Estos compuestos se obtuvieron de manera monodispersa, lo cual se comprobó mediante ¹H-RMN y espectrometría de masas, demostrando que la reacción CuAAC podría ser una buena herramienta para la síntesis de glicodendrones y glicodendrimeros mediante aproximaciones convergentes.

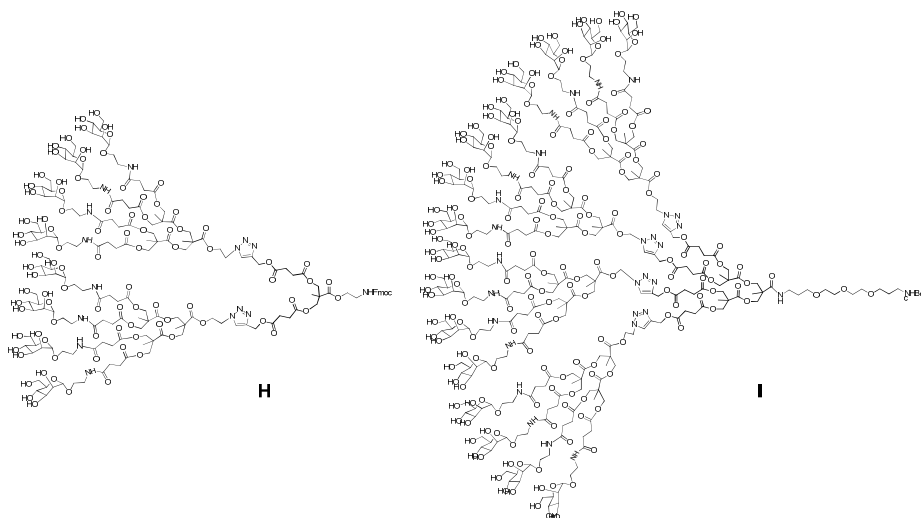


Figura 31. Sistemas octa- (**H**) y hexadecavalente (**I**) obtenidos mediante una estrategia sintética convergente a partir de bloques de construcción sencillos.

Además, tanto el glicodendrón tetravalente (**G**) como los obtenidos a partir de éste (**H** e **I**), disponían de grupos funcionales en sus posiciones focales que les permitirían reaccionar con otro tipo de biomoléculas de interés biológico como péptidos y ácidos nucleicos, bien mediante CuAAC, bien mediante formación de enlaces amida.

Siguiendo esta estrategia sintética, glicodendrones de diferente valencia y adecuadamente funcionalizados en su posición focal se utilizaron para la construcción de sistemas con gran potencial en usos terapéuticos, como por ejemplo, las glicodendriproteínas (Figura 32) o los glicodendrifullerenos (Figura 33).

Las glicodendriproteínas son una nueva clase de glicoconjugados preparados por unión de un glicodendrón sintetizado químicamente y una proteína adecuadamente funcionalizada obtenida por mutagénesis directa. La principal ventaja de este tipo de compuestos es que permite acceder de forma sencilla, a proteínas que cuentan en su superficie con estructuras complejas de carbohidratos, convirtiéndolas en potenciales herramientas para el estudio de interacciones proteína-carbohidrato.

Para obtener las glicodendriproteínas, el glicodendrón comentado anteriormente (**G**) se conjugó a la proteína escogida mediante CuAAC. Para abordar esta aproximación, se hizo necesario la incorporación de aminoácidos no naturales que contuviesen los grupos azida o alquino en una proteína elegida como modelo: L-Homoazidoalanina (Aha) y L-Homopropargilglicina (Hpg). Utilizando esta estrategia se llegó a obtener la proteína **M43AhaSsβG** funcionalizada con un glicodendrón de 4 manosas, tal y como se recoge en la figura.¹³⁰

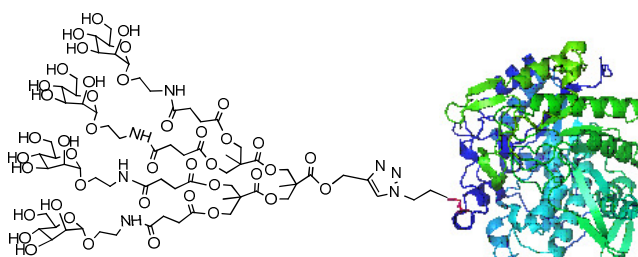


Figura 32. Glicodendriproteína preparada por reacción de la proteína **M43AhaSsβG** y el glicodendrón de 4 manosas **G**.

Por otro lado, en nuestro grupo de investigación se sintetizaron también glicodendrifullerenos (*sugarballs*) por conjugación de un fullereno C60 funcionalizado con grupos alquino en su superficie y una manosa monovalente o un dendrón de manosa divalente provistos de un grupo azida, dando lugar a estructuras con 12 o 24 carbohidratos en su superficie, respectivamente (Figura 33).^{131,132} La funcionalización química de fullerenos

¹³¹ M. Sánchez-Navarro, A. Muñoz, B. M. Illescas, J. Rojo, N. Martín, *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 766-769.

con grupos hidrofílicos es la herramienta más poderosa para su solubilización en disolventes polares, incluido el agua, además de ser un paso imprescindible para cualquier aplicación biológica de los mismos.

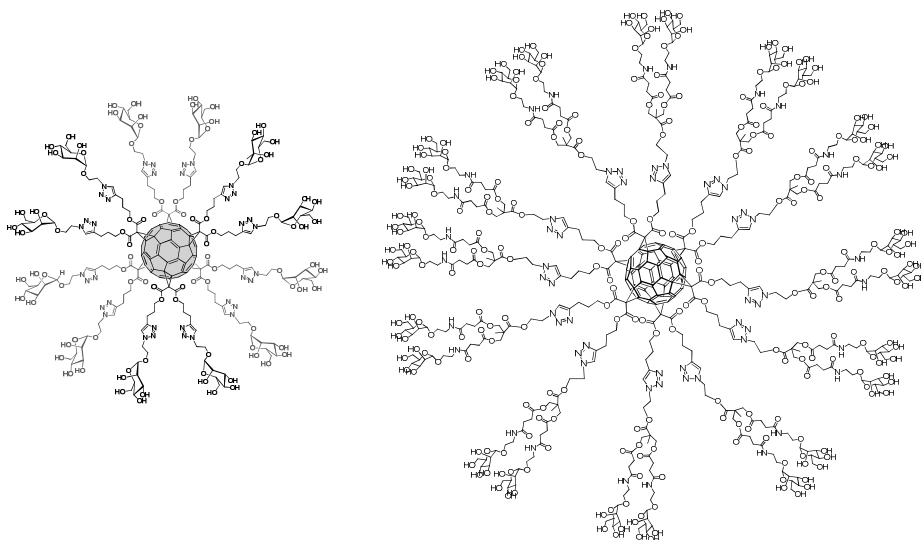


Figura 33. Glicodendriferulenos de 12 y 24 manosas.

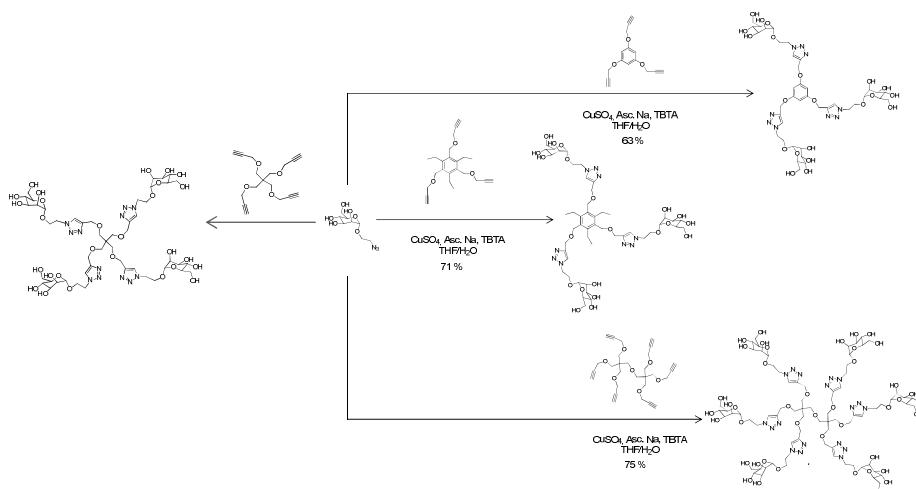
Estos sistemas eran solubles en agua e interactuaban con Concanavalina A de una manera multivalente, demostrando que la accesibilidad de los azúcares sobre la superficie del fullereno permitía su reconocimiento por parte de la lectina. Al mismo tiempo, mostraron una buena estabilidad y una baja toxicidad, lo cual apoyaba el uso de este tipo de sistemas en ensayos celulares. Además, el glicodendriferuleno con 12 manosas dio lugar a un IC_{50} de 2 μM en un ensayo de inhibición de la infección empleando un modelo del virus del Ébola, dato bastante prometedor para su utilización como inhibidor.

Dado el potencial de la *química click*, nuestro grupo de investigación decidió abordar la síntesis de glicodendrimeros basándose en este tipo de reacciones,¹³³ mejorando de esta manera los procedimientos de purificación y en consecuencia, los rendimientos. En este sentido, se sintetizaron pequeños glicodendrimeros a partir de núcleos de construcción sencillos, como prueba

¹³² J.-F. Nierengarten, J. Iehl, V. Oerthel, M. Holler, B. M. Illescas, A. Munoz, N. Martin, J. Rojo, M. Sanchez-Navarro, S. Cecioni, S. Vidal, K. Buffet, M. Durka, S. P. Vincent, *Chem. Commun.*, **2010**, 46, 3860-3862.

¹³³ R. Ribeiro-Viana, *Síntesis y evaluación biológica de sistemas glicodendríticos basados en la reacción de cicloadición 1,3-dipolar catalizada por Cu (I)*, Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, Sevilla, **2012**.

de concepto en la optimización de las condiciones de la reacción CuAAC para sistemas con carbohidratos desprotegidos (Esquema 11).



Esquema 11. Construcción de sistemas glicodendríticos basados en química click, a partir de núcleos de diferente multivalencia y manosa desprotegida.

Las condiciones de reacción se pusieron a punto para el sistema basado en pentaeritritol (tetraivalente), encontrándose las mejores condiciones cuando se usaba $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ como fuente de cobre, TBTA como ligando estabilizante de Cu^+ , ascorbato sódico como agente reductor *in situ* de Cu^{2+} a Cu^+ , y una mezcla de $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ como disolvente. De esta manera, se prepararon los glicodendrimeros representados en el esquema 11 con buenos rendimientos tras purificaciones sencillas.

Esta estrategia ponía de manifiesto el potencial de la cicloadición 1,3-dipolar entre azidas y alquinos en su aplicación a la construcción de sistemas glicodendríticos de diferente multivalencia.

A la vista de estos antecedentes del grupo de investigación se proponen los siguientes objetivos que constituyen el objeto de esta tesis doctoral.

2.2. Objetivos

El objetivo fundamental del trabajo que se presenta en esta Memoria es la preparación de sistemas glicodendríticos de una manera convergente como vehículos selectivos de moléculas de interés biológico hacia dianas celulares de interés terapéutico. Para ello nos serviremos de la capacidad del receptor DC-SIGN para internalizar compuestos en células dendríticas mediante el

reconocimiento de carbohidratos, fundamentalmente manosas. Se pretende además estudiar la interacción de este tipo de sistemas multivalentes con otras lectinas, situadas en la superficie de bacterias como *Escherichia Coli*.

También se ha planeado construir plataformas versátiles que permitan la bioconjugación de otro tipo de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) distintos de los carbohidratos, capaces de ser reconocidos por receptores diferentes que desencadenen respuestas inmunes diversas.

Para alcanzar este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos como parte del trabajo de la presente Memoria:

- ✓ Síntesis convergente de glicodendrimeros de manosa basados en la reacción de cicloadición 1,3-dipolar entre grupos azida y alquino catalizada por Cu(I) (CuAAC) y conjugación de los mismos a otros ligandos de interés (péptidos o PNAs-peptide nucleic acids) a través también de CuAAC.
- ✓ Síntesis de dendrones de maleimida de manera convergente para la conjugación de moléculas de interés terapéutico (péptidos) mediante adición tiol-eno. Estos sistemas estarán adecuadamente funcionalizados en su posición focal para su posterior reacción con sistemas glicodendríticos o ADNs (CpG) mediante *química click*.
- ✓ Construcción de sistemas híbridos que sirvan de plataforma para la presentación multivalente de distintos tipos de biomoléculas, para su aplicación en diferentes usos terapéuticos.
- ✓ Evaluación de la actividad biológica de los sistemas preparados en diferentes modelos celulares.

Capítulo

3

Síntesis mediante Química

Click de

Glicodendropéptidos como

Modelo de Vacuna Sintética

3. Síntesis mediante Química Click de Glicodendropéptidos como Modelo de Vacuna Sintética

3.1. Sistemas Peptídicos y su Aplicación al Desarrollo de Vacunas Sintéticas

3.1.1. Vacunación: Diseño Racional mediante el Conocimiento del Sistema Inmune

Dentro de la historia de la humanidad, la vacunación ha constituido uno de los descubrimientos más efectivos en la disminución de la mortalidad y la morbilidad causados por enfermedades infecciosas. Durante el siglo XX se han obtenido numerosos logros en este campo, llegándose al control de al menos diez de las enfermedades más importantes en el mundo.¹³⁴ Aún así, a pesar de los indiscutibles avances en la prevención de enfermedades, queda mucho por hacer.

Los primeros intentos de vacunas empleaban material infeccioso tanto por administración de dosis sub-letales del mismo, como mediante el uso de sustancias provenientes de una infección animal similar que se había observado inofensiva en humanos. Esta última, fue la estrategia empleada por Edward Jener en 1796, quien dirigió las primeras investigaciones para la prevención de enfermedades mediante experimentación en humanos.¹³⁵

Si bien es cierto que estos primeros intentos se llevaron a cabo sin conocimiento alguno en microbiología y virología, los avances en estas materias desde finales del siglo XIX en adelante proporcionaron numerosos progresos en el campo de la vacunación, basándose éstos en el entendimiento de la etiología de enfermedades infecciosas y de las interacciones huésped-patógeno.

Para diseñar una vacuna efectiva es necesario un conocimiento profundo de la inmunobiología con el fin de identificar el tipo y la calidad de las respuestas inmunes que ésta desencadena. Su diseño se debe basar en inducir una inmunidad protectora contra la enfermedad imitando la respuesta inmune natural, pero sin inducir el desarrollo de la enfermedad. En este sentido, es

¹³⁴ F. Zepp, *Vaccine*, **2010**, 28, Supplement 3, C14-C24.

¹³⁵ A. J. Morgan, S. Parker, *Clin. Exp. Immunol.*, **2007**, 147, 389-394.

necesario identificar los componentes más relevantes en la protección frente a una infección o una enfermedad, para lo cual se requiere un profundo entendimiento de los elementos celulares y moleculares del sistema inmune.

Un importante avance en el campo de la vacunación fue la demostración de que la administración de patógenos, ya fuese atenuados (transformados en no patogénicos) o inertes (patógenos inactivados bien por calentamiento, bien por desnaturalización química), daba lugar a una alta protección contra la enfermedad causada por dicho patógeno.^{136,137,138} De hecho, muchas vacunas empleadas hoy día se basan todavía en este tipo de estrategias.

Estas vacunas, formuladas con patógenos microbianos completos, contienen un amplio repertorio de epítomos diferentes que, en general, aseguran una actividad inmunoestimuladora eficiente entre una población inmunogenéticamente heterogénea. Sin embargo, hay ciertas desventajas asociadas al uso de estas estrategias entre las que se encuentran las siguientes: su efectividad puede verse disminuida por la presencia de anticuerpos circulantes, de anticuerpos maternos en infantes o por infecciones simultáneas; para el caso de vacunas basadas en patógenos atenuados, puede existir riesgo de aparición de enfermedad asociada a la vacuna o incluso puede tener lugar una reversión del estado atenuado a la forma virulenta, tal y como se ha documentado para la vacuna OPV (vacuna oral contra la polio);¹³⁹ normalmente se requieren múltiples dosis para proporcionar una estimulación del sistema inmune y dosis de recuerdo para asegurar su persistencia. En muchos casos, para mejorar la respuesta inmune se añaden también adyuvantes o virosomas.

Por estas razones, existe un especial interés en desarrollar vacunas que no estén constituidas por organismos completos. En concreto, la principal línea de investigación se dirige hacia el diseño de vacunas basadas en la selección de epítomos específicos que proporcionen una respuesta inmune efectiva, excluyendo aquellos que no sean reactivos o que causen efectos secundarios perjudiciales. Para ello es necesario un conocimiento exhaustivo del funcionamiento del sistema inmune y de los mecanismos de éste frente a infecciones concretas.

¹³⁶ M. P. Girard, D. Steele, C.-L. Chaignat, M. P. Kieny, *Vaccine*, **2006**, 24, 2732-2750.

¹³⁷ P. C. Griffin DE, *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, **2009**, 330, 191-212.

¹³⁸ H. F. Maassab, M. L. Bryant, *Rev. Med. Virol.*, **1999**, 9, 237-244.

¹³⁹ R. Sutter, O. Kew, S. Cochi, P. v. (live), In: S. Plotkin, W. Orenstein, P. Offit, editors., *Vaccines 5th ed.* New York: Elsevier, 631-686.

Para una protección a largo plazo frente a patógenos, se requiere la persistencia en el tiempo de sus anticuerpos específicos y la generación de células B de memoria capaces de desencadenar una rápida y efectiva reactivación. Además, para la erradicación de algunos microorganismos, es necesaria también una respuesta mediada por células T que ataquen directamente a las células infectadas. En ese sentido, las vacunas basadas en epítomos deben de estar constituidas por el mínimo número de determinantes antigénicos necesarios, capaces de ser reconocidos por *anticuerpos*, induciendo respuestas mediadas por células B, o por *células presentadoras de antígeno*, dando lugar a la proliferación de células T. Un diseño racional de dichas vacunas requiere correlaciones detalladas entre estas estructuras antigénicas (epítomos) y la respuesta protectora que se desea obtener, bien sea mediada por anticuerpos (*humoral*) o por células (*celular*).

Debido a las numerosas ventajas que tienen este tipo de vacunas frente a las que se basan en patógenos completos,^{140,141,142} a lo largo de los años se han desarrollado numerosas estrategias para el desarrollo de las mismas. Entre éstas se incluyen vacunas hechas mediante *producción de ADN recombinante* de proteínas antigénicas protectoras relevantes en bacterias, hongos o células animales y vegetales;^{143,144,145} *inmunización del huésped mediante introducción de genes* relevantes dentro del genoma de un vector adecuado,^{146,147,148} *vacunas de ADN* consistentes en un plásmido de ADN dentro del cual se han insertado genes relevantes del agente microbiano,^{149,150,151} y *péptidos sintéticos* que replican las mínimas características estructurales de epítomos virales, bacterianos o parasitarios

¹⁴⁰ M. J. Purcell AW, Rossjohn J., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2007**, 6, 404-414.

¹⁴¹ M. E. Patarroyo, M. A. Patarroyo, *Acc. Chem. Res.*, **2008**, 41, 377-386.

¹⁴² T. I. Skwarczynski M, *Curr. Drug Deliv.*, **2011**, 8, 282-289.

¹⁴³ D. Diminsky, N. Moav, M. Gorecki, Y. Barenholz, *Vaccine*, **1999**, 18, 3-17.

¹⁴⁴ J. R. Mascola, G. J. Nabel, *Curr. Opin. Immunol.*, **2001**, 13, 489-494.

¹⁴⁵ P. Mooij, J. L. Heeney, *Vaccine*, **2001**, 20, 304-321.

¹⁴⁶ A. Bukreyev, S. S. Whitehead, C. Prussin, B. R. Murphy, P. L. Collins, *J. Virol.*, **2000**, 74, 7151-7157.

¹⁴⁷ N. F. Rose, P. A. Marx, A. Luckay, D. F. Nixon, W. J. Moretto, S. M. Donahoe, D.

Montefiori, A. Roberts, L. Buonocore, J. K. Rose, *Cell*, **2001**, 106, 539-549.

¹⁴⁸ M. H. Skiadopoulos, J. M. Tatem, S. R. Surman, Y. Mitcho, S.-L. Wu, W. R. Elkins, B. R. Murphy, *Vaccine*, **2002**, 20, 1846-1852.

¹⁴⁹ A. Wierzbicki, I. Kiszka, H. Kaneko, D. Kmiecik, T. J. Wasik, J. Gzyl, Y. Kaneko, D. Kozbor, *Vaccine*, **2002**, 20, 1295-1307.

¹⁵⁰ A. F. John J. Donnelly, Douglas Martinez, Donna L. Montgomery, John W. Shiver, Sherri L. Motzel, Jeffrey B. Ulmer, Margaret A. Liu, *Nat. Med.*, **1995**, 1, 583-587.

¹⁵¹ H. L. Robinson, *Int. J. Mol. Med.*, **1999**, 4, 549-604.

requeridos para desarrollar una respuesta inmune protectora hacia el agente causante de la enfermedad.^{152,153,154}

En concreto, las vacunas basadas en *péptidos sintéticos* han despertado un especial interés como estrategia para el diseño de vacunas debido fundamentalmente, a la simplicidad, robustez y fiabilidad de sus métodos de producción frente a las otras aproximaciones mencionadas (Figura 34).¹⁴²

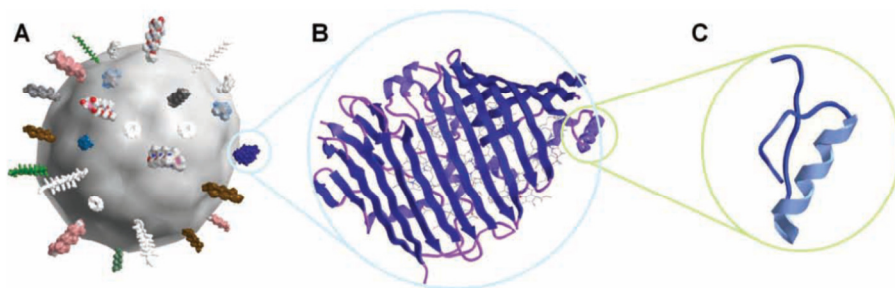


Figura 34. Evolución esquemática de las vacunas A) Vacuna clásica basada en el patógeno concreto completo; B) Vacuna basada en proteínas, y C) Vacuna basada en péptidos (epítomos).

Entre las muchas ventajas que posee el uso de vacunas basadas en *péptidos sintéticos*, podemos señalar el hecho de que éstos pueden ser producidos en gran escala con un nivel de definición química elevado. Además, son altamente estables, pudiéndose conservar con un mínimo refrigerado o incluso a temperatura ambiente durante un tiempo razonable. Este tipo de vacunas ofrecen también una flexibilidad estructural mucho mayor que la de otro tipo de estrategias, incluyendo la posibilidad de presentar epítomos de más de un patógeno, o varios epítomos del mismo. Otra ventaja a destacar, es que se pueden incorporar aminoácidos no naturales y unidades peptidomiméticas, lo cual abre nuevas posibilidades al diseño racional en vaccinología.¹⁴⁰

Sin embargo, uno de los principales problemas del uso de péptidos sintéticos es su moderada o incluso baja inmunogenicidad. Para superar este problema se han diseñado numerosas estrategias, como por ejemplo la adición de adyuvantes, como las sales de aluminio,¹⁵⁵ o el anclaje a transportadores macromoleculares (proteínas -como BSA, OVA, etc.-, eritrocitos, liposomas,

¹⁵² J. B. Dale, E. Y. Chiang, D. L. Hasty, H. S. Courtney, *Infect. Immun.*, **2002**, 70, 2166-2170.

¹⁵³ J. P. Tam, *J. Immunol. Methods*, **1996**, 196, 17-32.

¹⁵⁴ S. Tourdot, M. Oukka, J. C. Manuguerra, V. Magafa, I. Vergnon, N. Riché, M. Bruley-Rosset, P. Cordopatis, K. Kosmatopoulos, *J. Immunol.*, **1997**, 159, 2391-2398.

¹⁵⁵ C. A. Cox J., *BioDrugs*, **1999**, 12, 439-453.

etc). Aún así, entre estas estrategias se encuentran también algunas limitaciones, como es el caso del uso de proteínas transportadoras, el cual en ocasiones da lugar a la aparición de anticuerpos específicos frente a las mismas. Una aproximación que evita la formación de estos anticuerpos y que al mismo tiempo permite la presentación simultánea de varios epítomos, es el sistema introducido por Tam en los años 80 y conocido como sistemas MAP (*Multiple Antigen Peptide system*).¹⁵⁶

3.1.2. Sistemas MAP (Multiple Antigen Peptide systems)

Los *sistemas MAP*, consisten en construcciones moleculares dendríméricas basadas en esqueletos de polilisina (Figura 35).

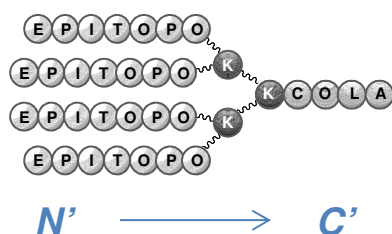


Figura 35. Estructura esquemática de los sistemas dendríticos MAPs. K (Lys): Lisina.

El *aminoácido lisina* (Lys o K) es un monómero ideal para crear puntos de ramificación, gracias tanto al grupo amino α - como al grupo amino ϵ - de la cadena lateral (Figura 36). Sobre estos puntos de ramificación se pueden anclar secuencias de epítomos péptidos dando como resultado, una macromolécula péptida con las características adecuadas para ser utilizada como inmunógeno.

¹⁵⁶ J. P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1988**, 85, 5409-5413.

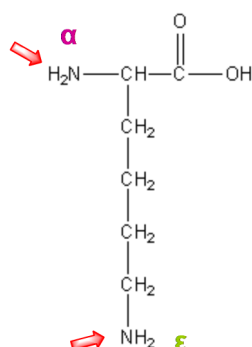


Figura 36. Estructura de la Lisina. Sus dos grupos amino (α - y ϵ -), hacen de este aminoácido un excelente bloque de formación de puntos de ramificación.

En el diseño original, descrito por J. P. Tam en los años 80,¹⁵⁵ el MAP era un simple dendrón que radiaba directamente desde el corazón de lisina (Figura 37, A), pudiendo ser naturalmente extendido en construcciones arbóreas donde una única secuencia se ramifica en 2ⁿ ramificaciones (Figura 37, B, C, D). El sistema se podría ver como una macromolécula donde la relación entre péptido inmunogénico/núcleo es lo suficientemente grande como para ser utilizado como un inmunógeno, sin necesidad de conjugación a una proteína transportadora.

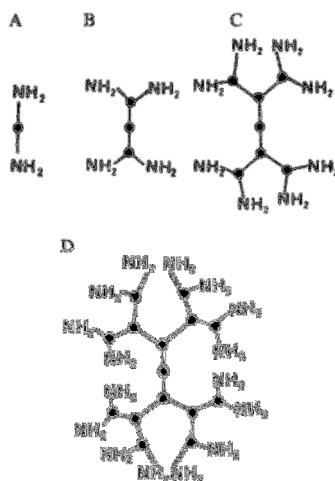


Figura 37. Representación esquemática del núcleo del MAP descrito por Tam. A) Primer nivel, divalente; B) segundo nivel, tetravalente; C) tercer nivel, octavalente, y D) cuarto nivel, hexadecavalente.

En base a este prototipo inicial se han introducido un elevado número de mejoras, la mayoría de las cuales se han logrado gracias a la optimización de los procesos sintéticos.¹⁵³ Entre éstas, el empleo de reacciones de la *química click* ha tenido especial relevancia en el desarrollo y síntesis de nuevos sistemas MAP. También, la optimización de procesos automatizados de síntesis en fase sólida (SPPS, de *Solid Phase Peptide Synthesis*), ha supuesto un gran avance en la construcción de estas plataformas.

Como otros dendrímeros, los MAPs pueden construirse mediante dos aproximaciones sintéticas: *convergente* (método indirecto) y *divergente* (método directo). Ambas aproximaciones requieren el corazón de lisina como punto de ramificación (Esquema 12).¹⁵⁷

En el *método indirecto* o *convergente* el núcleo, sintetizado mediante SPPS (*Solid Phase Peptide Synthesis*), es funcionalizado apropiadamente en cada brazo para dar una plataforma multivalente a la cual se anclarán en disolución los epítopos (también obtenidos por SPPS) de manera quimioselectiva (Esquema 12). En este tipo de síntesis se utilizan reacciones de conjugación típicas de la *química click* como las de formación de tioéteres,¹⁵⁸ disulfuros,¹⁵⁹ hidrazonas¹⁶⁰ u oximas.¹⁶¹ La principal ventaja de esta metodología es la definición química, ya que tanto el núcleo como el segmento peptídico, son previamente purificados. Por lo tanto, se limita el número de subproductos que se puedan formar, facilitando la purificación final. Por otro lado, la síntesis convergente, requiere más pasos que la divergente, incluyendo purificaciones adicionales y caracterización de los intermedios.

La *síntesis directa* o *divergente* recae completamente en la SPPS paso a paso. En este método, la síntesis del núcleo del MAP comienza por el residuo C-terminal y continúa de manera iterativa hasta llegar a dos, cuatro o incluso ocho ramificaciones, utilizando la lisina como punto de ramificación (Esquema 12). Una vez llegado este punto, el péptido antigénico se extiende aminoácido a aminoácido a lo largo de cada brazo hasta llegar a la secuencia deseada. Para la SPPS, se pueden utilizar *estrategias Boc*¹⁶² o *Fmoc*¹⁶³, en

¹⁵⁷ W. Kowalczyk, M. Monsó, B. G. de la Torre, D. Andreu, *J. Pept. Sci.*, **2011**, 17, 247-251.

¹⁵⁸ J.-P. Defoort, B. Nardelli, W. Huang, J. P. Tam, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1992**, 40, 214-221.

¹⁵⁹ K. Rose, W. Zeng, L. E. Brown, D. C. Jackson, *Mol. Immunol.*, **1995**, 32, 1031-1037.

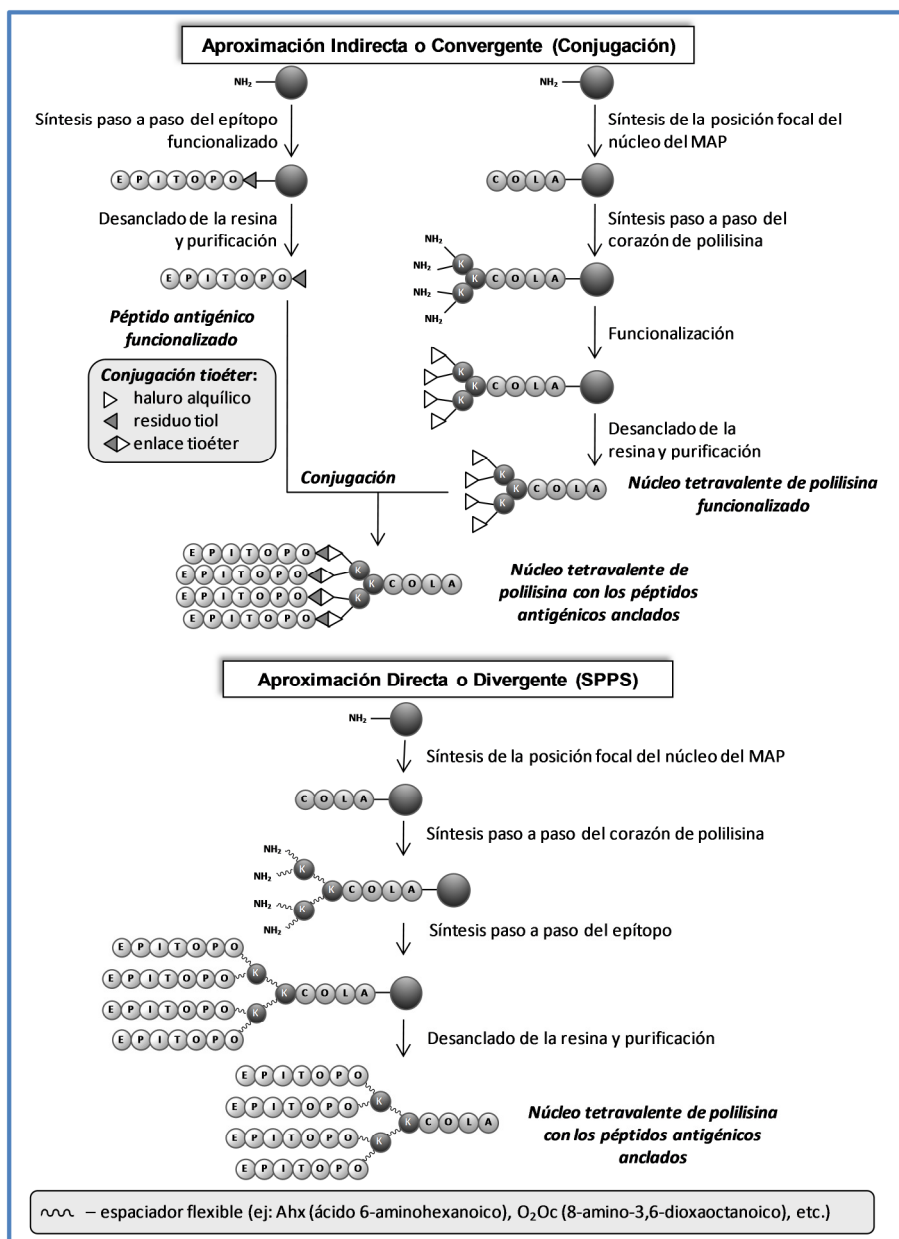
¹⁶⁰ J. C. Spetzler, J. P. Tam, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1995**, 45, 78-85.

¹⁶¹ J. W. Drijfhout, W. Bloemhoff, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1991**, 37, 27-32.

¹⁶² T. Koch, H. F. Hansen, P. Andersen, T. Larsen, H. G. Batz, K. Otteson, H. ØRum, *J. Peptide Res.*, **1997**, 49, 80-88.

¹⁶³ G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1990**, 35, 161-214.

función de cuáles sean los grupos protectores de los aminoácidos o espaciadores empleados.



Esquema 12. Protocolo general para la síntesis de MAPs mediante dos estrategias: aproximación indirecta o convergente, y aproximación directa o divergente.

La rapidez y la eficiencia son las claras ventajas de esta estrategia divergente, ya que los intermedios no necesitan ser purificados ni caracterizados. Sin

embargo, dado que la cadena peptídica se hace crecer sobre el núcleo, la probabilidad de que se den ciertos episodios imprevisibles y no deseables, como por ejemplo agregación de cadenas o acoplamientos incompletos de aminoácidos aumenta, lo cual puede dar lugar a productos finales complejos y heterogéneos difíciles de purificar. En este sentido, el grupo del Profesor David Andréu ha solucionado este problema mediante la introducción de espaciadores flexibles en los puntos de ramificación, los cuales mejoraban substancialmente el proceso de SPPS mediante una estrategia divergente, llegando a ser incluso más eficiente que la aproximación indirecta, especialmente cuando estaban implicados epítomos problemáticos.¹⁶⁴

3.1.3. Aplicaciones de los MAPs

Desde su descubrimiento, los MAPs han encontrado numerosas aplicaciones biológicas en el campo de las vacunas y diagnosis.¹⁶⁵

Posiblemente la aplicación biológica más conocida es su uso como inmunógenos con la habilidad de inducir una respuesta inmune *in vivo*.¹⁶⁵ En este sentido, los MAPs tienen numerosas ventajas como la simplicidad en el diseño y en la síntesis, la versatilidad y la fiabilidad de ser capaces de generar anticuerpos específicos. El sistema MAP ofrece además la posibilidad de combinar en una única macromolécula epítomos capaces de estimular respuestas humores (epítomos de células B o T_{H2}) y respuestas celulares (epítomos de CTL o T_{H1}), lo cual permite modular la respuesta inmune.¹⁶⁶ Esta característica les confiere una flexibilidad estructural que no es fácilmente alcanzable mediante otras aproximaciones.

Las condiciones de seguridad, selectividad y definición química que requieren las vacunas basadas en péptidos se encuentran reunidas de manera ideal en las construcciones MAP, por lo que constituyen una potente alternativa a las vacunas tradicionales: su diseño optimizado asegura que sólo contienen aquellos epítomos necesarios para desencadenar una respuesta inmune óptima; se pueden producir a gran escala mediante métodos altamente eficientes, químicamente bien establecidos y automatizables, y pueden ser fácilmente almacenados y transportados sin refrigeración. Por todo esto, numerosas investigaciones se han llevado a cabo en el diseño y desarrollo de vacunas basadas en construcciones MAP. Además, su uso ha resultado especialmente

¹⁶⁴ W. Kowalczyk, B. G. de la Torre, D. Andreu, *Bioconjugate Chem.*, **2010**, 21, 102-110.

¹⁶⁵ J. Rojo, *Anti-Infect. Agents Med. Chem.*, **2009**, 8, 50-72.

¹⁶⁶ J. P. T. Kristen Sadler, *J. Biotechnol.*, **2002**, 90, 195-229.

interesante también en inmunoensayos, serodiagnos, mapeo de epítomos e interacción de ligandos, producción de linfocitos T citotóxicos (CTL) y anticuerpos, así como en otros propósitos.

3.1.4. Manosilación de Péptidos y Proteínas

En 1997, Pieters¹⁶⁷ y Koning¹⁶⁸ describieron simultáneamente los efectos biológicos de la manosilación de péptidos y proteínas, la cual facilitaba la internalización de los mismos por parte de células que expresan receptores de manosa en su superficie, dando lugar a una fuerte estimulación de las células T.

Este descubrimiento ha abierto el camino al desarrollo de nuevas estrategias en el campo de la vacunación, especialmente para aquellos casos en los que las vacunas convencionales no han tenido suficiente éxito como por ejemplo, en el caso del cáncer o del VIH. Desde entonces, se han descrito numerosas aproximaciones sintéticas para obtener péptidos o proteínas manosiladas,¹⁶⁵ incluyendo la manosilación directa de inmunógenos^{169,170} o diferentes estrategias indirectas utilizando residuos funcionales donde acoplar las unidades de manosa.^{171,172}

Aunque los compuestos preparados de este modo han demostrado diversas respuestas inmunogénicas tanto *in vitro* como *in vivo*, lo cual demuestra el potencial de esta estrategia de manosilación, estas metodologías no son fácilmente ajustables y tienden a dar materiales polidispersos. Por ello, es necesario establecer metodologías que transcurran con un control y definición químicos que permitan la obtención de sistemas peptídicos manosilados de manera monodispersa.

¹⁶⁷ A. J. Engering, M. Cella, D. Fluitsma, M. Brockhaus, E. C. M. Hoefsmit, A. Lanzavecchia, J. Pieters, *Eur. J. Immunol.*, **1997**, 27, 2417-2425.

¹⁶⁸ M. C. A. A. Tan, A. M. Mommaas, J. W. Drijfhout, R. Jordens, J. J. M. Onderwater, D. Verwoerd, A. A. Mulder, A. N. van der Heiden, D. Scheidegger, L. C. J. M. Oomen, T. H. M. Ottenhoff, A. Tulp, J. J. Neeffjes, F. Koning, *Eur. J. Immunol.*, **1997**, 27, 2426-2435.

¹⁶⁹ J. S. Lam, M. K. Mansour, C. A. Specht, S. M. Levitz, *J. Immunol.*, **2005**, 175, 7496-7503.

¹⁷⁰ M. Luong, J. S. Lam, J. Chen, S. M. Levitz, *Vaccine*, **2007**, 25, 4340-4344.

¹⁷¹ C. Grandjean, C. Rommens, H. Gras-Masse, O. Melnyk, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39, 1068-1072.

¹⁷² J. Wang, H. Li, G. Zou, L.-X. Wang, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, 5, 1529-1540.

Así, combinando las ventajas de la presentación multivalente de epítopos peptídicos en construcciones MAP con la mejora de la manosilación en términos de internalización, se podrían obtener construcciones híbridas con perfiles inmunogénicos mejorados. Específicamente, la manosilación de MAPs podría inducir su internalización en células dendríticas mediante interacción con el receptor DC-SIGN, desencadenando una respuesta inmune. Además dado que DC-SIGN, tal y como se ha comentado anteriormente, reconoce estructuras altamente manosiladas, el uso de glicodendrones como unidad de manosilación podría dar lugar a una mejor internalización de los sistemas peptídicos.

Recientemente, en nuestro laboratorio se ha demostrado que el glicodendrón nonavalente de manosa representado en la figura 38, tiene el tamaño y la valencia adecuados para interaccionar con razonable afinidad con DC-SIGN, dando lugar a la internalización de los mismos en células dendríticas (Figura 39).¹⁷³

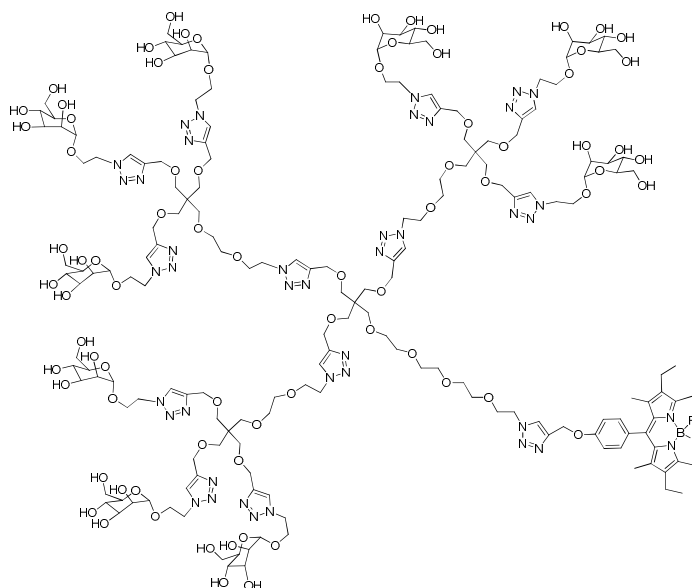


Figura 38. Estructura del dendrón nonavalente de manosa funcionalizado con un grupo fluoróforo (BODIPY) en su posición focal .

¹⁷³ R. Ribeiro-Viana, J. J. García-Vallejo, D. Collado, E. Pérez-Inestrosa, K. Bloem, Y. van Kooyk, J. Rojo, *Biomacromolecules*, **2012**, *13*, 3209-3219.

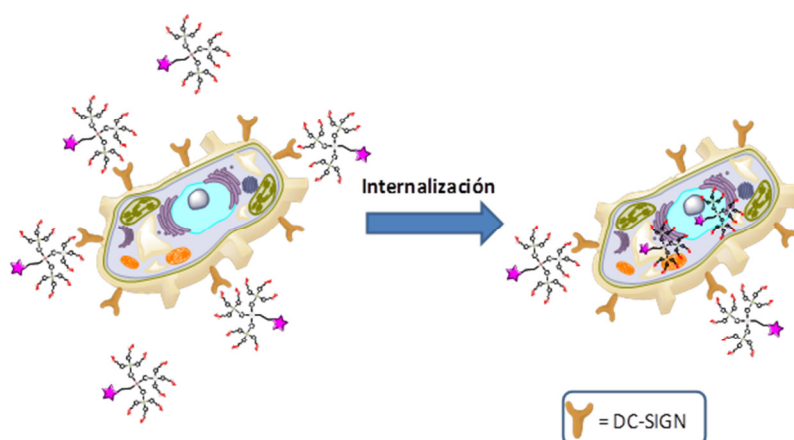


Figura 39. Internalización en células dendríticas del glicodendron novalente de manosa marcado fluorescentemente por interacción con DC-SIGN.

Para llevar a cabo dicha demostración, se diseñó un experimento en el que glicodendrones de manosa, fucosa y maltotriosa marcados fluorescentemente, eran incubados con células dendríticas a dos temperaturas distintas: a 4°C, temperatura en la que no ocurren procesos de internalización, y a 37°C en la que sí tienen lugar este tipo de procesos. Transcurrida la incubación, se llevaron a cabo experimentos de citometría de flujo y microscopía confocal para estudiar la internalización de dichos sistemas. De estos estudios se pudo deducir que a 4°C los compuestos de fucosa y manosa se situaban a lo largo de la membrana celular, lo cual se podría explicar por posibles interacciones específicas con receptores de membrana. A 37°C, se observó claramente la internalización de dichos sistemas (Figura 40). Para el sistema de maltotriosa (control negativo), aunque se observó una pequeña internalización a 37°C, a 4°C no se vio diferencia significativa en la fluorescencia alrededor de la membrana en comparación con las células no tratadas (Figura 40), lo cual indicaba que no existían interacciones con receptores de membrana y que la internalización a 37°C podría ser debida a procesos de endocitosis no mediados por receptor, hecho que suele observarse de manera habitual.

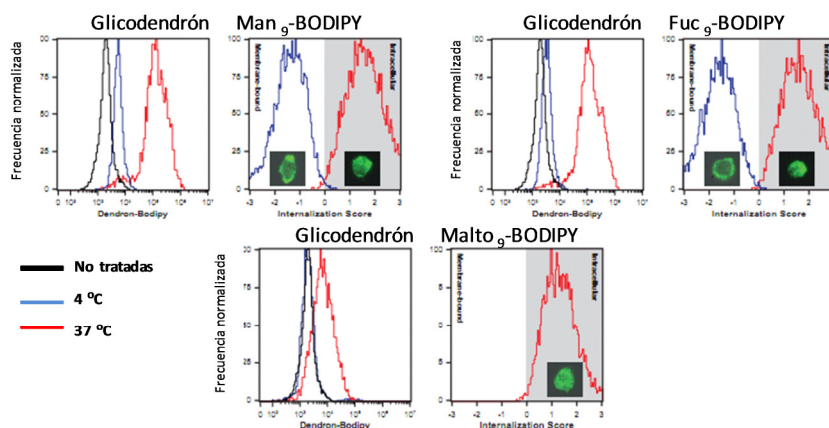


Figura 40. Histogramas del ensayo de internalización de los glicodendrones novalentes de manosa, fucosa y maltotriosa marcados fluorescentemente. Se pueden observar también las fotografías obtenidas mediante microscopía confocal.

Para demostrar que esta internalización estaba mediada por la interacción con DC-SIGN, se llevó a cabo un estudio de afinidad mediante la técnica ELISA. Como cabía esperar a partir de los resultados previos, los glicodendrones novalentes de manosa y fucosa interaccionaban con la lectina, mientras que el sistema de maltotriosa no presentaba afinidad por dicho receptor.

Por tanto, dado que estos sistemas novalentes de carbohidrato son internalizados en células dendríticas mediante interacción con DC-SIGN, podrían actuar como transportadores de moléculas de interés terapéutico hacia el sistema inmune, obteniéndose una respuesta inmune más efectiva. En este sentido, nuestro trabajo pretende combinar las mejoras de la presentación multivalente de péptidos (MAP) con el uso de glicodendrones capaces de interaccionar con receptores de membrana como DC-SIGN, dando lugar a estructuras híbridas (glicodendropéptidos) con propiedades inmunogénicas mejoradas. Estos sistemas, podrían constituir una plataforma novedosa y versátil para aplicaciones en el campo de las vacunas sintéticas.

3.1.5. Péptidos Inmunogénicos de Interés Terapéutico como Epítopos para la Construcción de Sistemas Multivalentes

Dada la flexibilidad sintética de los sistemas MAP se podría elegir prácticamente cualquier epítipo, lo cual da idea de la versatilidad de estas estructuras, pudiéndose emplear en un gran número de aplicaciones biológicas en función del péptido elegido.

En nuestro caso hemos elegido, por un lado, tres péptidos provenientes de diferentes proteínas del virus influenza A o virus de la gripe (M2e, sM2e y NP₃₆₆₋₃₇₄), y por otro, dos péptidos relacionados con la ovoalbúmina (OT1 y OT2).

El virus influenza A es uno de los patógenos respiratorios más importantes en el mundo y la mejor forma de controlarlo es mediante la vacunación.¹⁷⁴ Aún así, al contrario que en la vacunación contra otros organismos patógenos donde ésta tiene lugar de una a tres veces a lo largo de la vida del individuo, las vacunas contra el virus influenza deben ser administradas anualmente. Esto es debido a que este virus tiene una extraordinaria capacidad de mutar, modificando las características antigénicas de sus principales proteínas de membrana, *hemaglutinina* (HA) y *neuraminidasa* (NA).

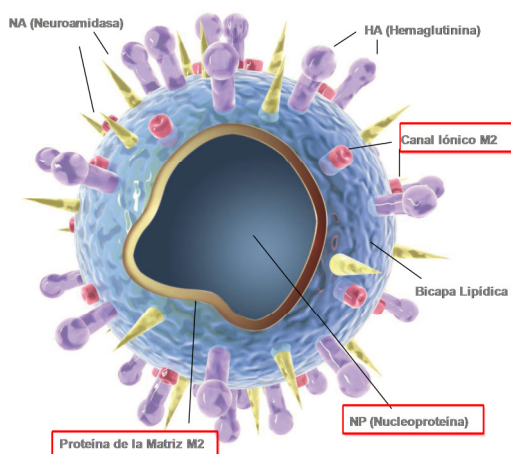


Figura 41. Virus Influenza A humano o virus de la gripe. Una vacuna universal contra este virus podría basarse en proteínas "conservadas" como M2 o nucleoproteínas (NP) internas.

Es por ello, que para desarrollar una vacuna universal contra el virus influenza A, el mejor modo podría ser la utilización de proteínas "conservadas" que no muten demasiado año tras año.¹⁷⁵ Una de las estrategias propuestas más puntera en este sentido, está basada en una proteína denominada M2.

¹⁷⁴ M. De Filette, W. Fiers, W. Martens, A. Birkett, A. Ramne, B. Löwenadler, N. Lycke, W. M. Jou, X. Saelens, *Vaccine*, **2006**, 24, 6597-6601.

¹⁷⁵ J. Kaiser, *Science*, **2006**, 312, 380-382.

Las proteínas M2 forman un canal de protones en la superficie del virión que se activa por el cambio de pH y que media en la liberación de las partículas virales de los endosomas en el interior de la célula infectada.^{176,177}

Esta proteína M2 está constituida por tres regiones principales:

- *Secuencia N-terminal*, ectodominio constituido por 24 aa (M2e)
- *Región transmembrana*, formada por 19 aa que tetrametizan para formar parte del canal de protones¹⁷⁸
- *Cola citoplasmática* (54 residuos)

En concreto, el dominio N-terminal de la proteína M2 (M2e), está altamente conservado entre las diferentes cepas del virus influenza humano desde 1933, cuando se aisló la primera cepa (Tabla 1). Esta remarcable falta de variabilidad genética, su relativo pequeño tamaño y el hecho de que los anticuerpos de M2e protegen de la mortalidad por influenza A mediante una respuesta inmune humoral,^{179,180,181} han hecho a este epítipo muy popular, no sólo para estudios de inmunogenicidad sino también para su potencial uso como vacuna.

Virus	Subtipo	Secuencia de aminoácidos
A/Wilson-Smith/1933	H1N1	MSLLTEVETPIRNEWGCRNDSSD
A/Puerto Rico/8/34	H1N1	MSLLTEVETPIRNEWGCRNGSSD
A/Wisconsin/3523/88	H1N1	MSLLTEVETPIRNEWGCRNDSSD
A/Cambodia/04/2009	H1N1	MSLLTEVETPIRNEWGCRNDSSD
A/Alma/47/08	H5N1	MSLLTEVETPIRNEWGCRNDSSD
A/Hanoi/1995	H5N2	MSLLTEVETPIRNEWGCRNDSSD
A/Viet Nam/1203/2004	H5N1	MSLLTEVETPIRNEWGCRNDSSD
A/Chicken/Nakhon-Patoom/Thailand	H5N1	MSLLTEVETPIRNEWGCRNDSSD
A/Thailand/1(KAN-1)/04	H5N1	MSLLTEVETPIRNEWGCRNDSSD
A/Hong Kong/156/97	H5N1	MSLLTEVETLIRNGWGCRCSDSSD
A/Duck/1525/81	H5N1	MSLLTEVETPIRNGWECRCSDSSD
A/Chicken/New York/95	H7N2	MSLLTEVETPIRNGWECRCSDSSD
Consenso		MSLLTEVETPIRNEWESRSSDSSD

Tabla 1. Secuencias conservadas del ectodominio de la proteína M2 (M2e) a lo largo de múltiples cepas del virus influenza A. Las dos serinas subrayadas en la secuencia consensuada se han introducido como un sustituto isostérico de la cisteína, para evitar problemas sintéticos.

¹⁷⁶ A. L. Stouffer, R. Acharya, D. Salom, A. S. Levine, L. Di Costanzo, C. S. Soto, V. Tereshko, V. Nanda, S. Staybrook, W. F. DeGrado, *Nature*, **2008**, 451, 596-599.

¹⁷⁷ S. D. Cady, W. Luo, F. Hu, M. Hong, *Biochemistry*, **2009**, 48, 7356-7364.

¹⁷⁸ J. R. Schnell, J. J. Chou, *Nature*, **2008**, 451, 591-595.

¹⁷⁹ J. J. Treanor, E. L. Tierney, S. L. Zebedee, R. A. Lamb, B. R. Murphy, *J. Virol.*, **1990**, 64, 1375-1377.

¹⁸⁰ A. J. W. A J Hay, J J Skehel, and M H Smith, *EMBO J.*, **1985**, 4, 3021-3024.

¹⁸¹ S. L. Zebedee, R. A. Lamb, *J. Virol.*, **1988**, 62, 2762-2772.

Sin embargo, dado que en la naturaleza M2 forma un tetrámero, M2e presenta una fuerte tendencia a la autoagregación lo cual da muchos problemas en la síntesis de MAPs.

Por ello, el grupo del Profesor David Andreu optimizó la síntesis de este tipo de construcciones utilizando una versión corta del epítipo M2e (sM2e, de *short* M2e).¹⁶⁴ Este péptido era mucho más sencillo de preparar y no presentaba evidencias de multimerización.

Como primera aproximación para la síntesis en fase sólida del MAP del sM2e, se probó con un dendrón clásico de polilisina con cuatro copias de péptido (tipo 1, Figura 42). Esta síntesis se llevó a cabo de manera satisfactoria utilizando una resina *Rink amide ChemMatrix* y protocolos *Fmoc* con acoplamientos dobles a lo largo de la secuencia del epítipo. Posteriormente, y anticipándose a las dificultades que pudiese dar la secuencia completa de M2e en la construcción de estos sistemas, se decidió aumentar la flexibilidad total del esqueleto del MAP mediante el uso de unidades espaciadoras de ácido 6-aminohexanoico (Ahx) en cada punto de ramificación (tipo 2, Figura 42). Esta nueva estrategia se probó en primer lugar con la versión corta del epítipo, dando lugar a un producto limpio y fácilmente purificable. Una vez optimizada la síntesis para sM2e, se procedió a la preparación del MAP tipo 2 para la secuencia completa del epítipo M2e. Al igual que para sM2e, ésta también transcurrió de modo eficiente, superándose así los problemas encontrados al llevar a cabo la síntesis de MAPs de péptidos problemáticos como M2e mediante otro tipo de estrategias (como por ejemplo, métodos convergentes). Por todo esto, y a pesar de que esta secuencia corta (sM2e) no genera anticuerpos, se escogió para poner a punto la síntesis de nuestros sistemas glicodendropeptídicos.

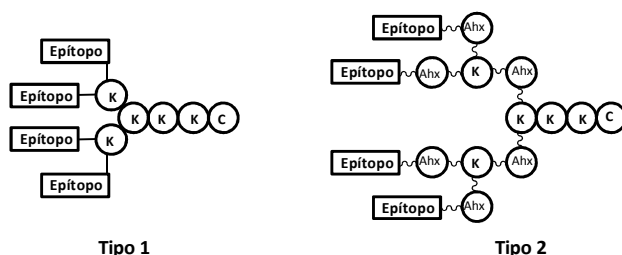


Figura 42. Representación esquemática de los tipos de MAP que se probaron para la optimización de la síntesis de sistemas con péptidos problemáticos como M2e. Ahx: ácido 6-aminohexanoico (espaciador).

Otra aproximación para obtener una vacuna universal contra el virus de la gripe se basa en la utilización de proteínas internas conservadas como las *nucleoproteínas* (NP), para provocar un tipo de inmunidad diferente basada en células T citotóxicas.¹⁷⁵ Estas células, denominadas también CTLs o CD8+, reconocen y matan células infectadas que expresan antígenos virales en su superficie como por ejemplo, fragmentos de proteínas como NP.¹⁸²

Durante las infecciones naturales, los linfocitos T citotóxicos aparecen pronto y normalmente están asociados al control de la viremia. Estos linfocitos CD8+ representan un importante componente para la respuesta inmune y terapéutica frente a bacterias, virus y tumores, gracias a su capacidad de reconocer péptidos extraños unidos a las moléculas del complejo de histocompatibilidad mayor de clase I (MHC-I).¹⁸³ Las proteínas exógenas liberadas en el interior de la célula infectada son desnaturalizadas por el proteosoma y transportadas mediante el transportador de péptidos inmunogénicos al lumen del retículo endoplasmático (ER), donde se unen a moléculas del MHC-I (Figura 43). Es entonces cuando los complejos péptido/MHC-I son dirigidos a la superficie de la célula, pudiendo ser reconocidos por los receptores de las células CD8+ vírgenes. Esto desencadena la activación y la diferenciación de las CTLs en células CTL efectoras. En la fase siguiente, mientras que la mayoría de las células efectoras CD8+ específicas del antígeno mueren por apoptosis, algunas sobreviven y se diferencian en células CD8+ T de memoria.

¹⁸² A. R. M. Townsend, J. Rothbard, F. M. Gotch, G. Bahadur, D. Wraith, A. J. McMichael, *Cell*, **1986**, 44, 959-968.

¹⁸³ L. de Haan, A. R. Hearn, A. J. Rivett, T. R. Hirst, *Infect. Immun.*, **2002**, 70, 3249-3258.

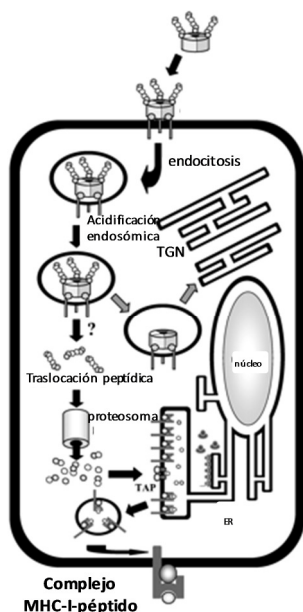


Figura 43. Procesado de virus o bacterias por parte de las células infectadas para dar lugar a complejos péptido/MHC-I, capaces de ser reconocidos por linfocitos T.

Como se ha comentado anteriormente, el objetivo fundamental de la vacunación es desarrollar protección inmunológica de larga vida que prevenga completamente la reinfección o que reduzca la severidad de la enfermedad. En este sentido, el uso de *fragmentos de nucleoproteínas* (NP) como NP₃₆₆₋₃₇₄, que den lugar a la formación de células CD8⁺ de memoria, podría ser una buena estrategia para desarrollar una vacuna universal contra el virus influenza A.¹⁸⁴

Por tanto, el concepto clásico de presentación antigénica se basa en que *antígenos exógenos* son expresados en la superficie de las células mediante la formación de complejos con moléculas del MHC-II tras ser procesados en compartimentos endo-lisomáticos, mientras que los *antígenos endógenos* son unidos como fragmentos peptídicos a moléculas del MHC-I por el proteosoma en el interior del citosol.¹⁸⁵ Sin embargo, las DCs tienen la habilidad única de presentar antígenos exógenos en forma de moléculas MHC-I a través de un fenómeno conocido como *presentación cruzada*.¹⁸⁶ Por tanto, el tratamiento de DCs con péptidos exógenos podría potencialmente

¹⁸⁴ P. Castiglioni, M. Gerloni, M. Zanetti, *Vaccine*, **2004**, 23, 699-708.

¹⁸⁵ C. A. Janeway, Jr., R. Medzhitov, *Annu Rev Immunol*, **2002**, 20, 197-216.

¹⁸⁶ F. R. Carbone, M. J. Bevan, *J. Exp. Med.*, **1990**, 171, 377-387.

desencadenar la presentación a través de MHC-I o MHC-II, dando lugar a la activación de linfocitos CD8+ o CD4+, respectivamente, lo cual podría tener numerosas aplicaciones en el desarrollo de vacunas.

En este sentido, es ampliamente conocido que diferentes epítomos de la proteína ovoalbúmina (OVA) desencadenan distintas señalizaciones modulando la respuesta inmune hacia la activación de linfocitos CD8+ (OVA₂₅₇₋₂₆₄ u OT1) o de linfocitos CD4+ (OVA₃₂₃₋₃₃₉ u OT2).¹⁸⁷ Por ello, el grupo de la Profesora Yvette van Kooyk ha empleado estos péptidos en diversas ocasiones para el estudio de la interacción de sistemas de carbohidratos con DC-SIGN, empleando ratones transgénicos que expresan dicha lectina en sus células dendríticas.^{188,189} De estos estudios, se puede extraer que dichos péptidos constituyen unas importantes herramientas para el desarrollo de potenciales vacunas, gracias a su potente capacidad inmunoestimuladora de respuestas mediadas por células T.

3.2. Objetivos

Por todo lo expuesto anteriormente, los péptidos comentados han sido seleccionados como epítomos interesantes para funcionalizar nuestros *glicodendropéptidos* (GDPs), con el fin de desarrollar potenciales vacunas frente a diferentes dianas terapéuticas. Se pretende establecer una metodología sencilla y versátil, que permita obtener estructuras híbridas multivalentes de manera rápida y fiable. Estas estructuras estarían compuestas por glicodendrones de manosa de diferente valencia, cuya función consistiría en dirigir y facilitar la internalización del otro residuo, el peptídico, por parte de células dendríticas mediante la interacción con el receptor DC-SIGN.

En este sentido, se plantea desarrollar diferentes estrategias sintéticas complementarias y versátiles, tanto convergentes como divergentes, que den lugar a la obtención de GDPs. Ambas estrategias se basarán en la *química click*, en concreto en dos reacciones: la cicloadición 1,3-dipolar catalizada por

¹⁸⁷ T. Bickert, G. Wohlleben, M. Brinkman, C. M. Trujillo-Vargas, C. Ruehland, C. O. Reiser, J. Hess, K. J. Erb, *Med Microbiol Immunol*, **2007**, *196*, 31-39.

¹⁸⁸ S. K. Singh, J. Stephani, M. Schaefer, H. Kalay, J. J. García-Vallejo, J. den Haan, E. Saeland, T. Sparwasser, Y. van Kooyk, *Mol. Immunol.*, **2009**, *47*, 164-174.

¹⁸⁹ W. W. J. Unger, A. J. van Beelen, S. C. Bruijns, M. Joshi, C. M. Fehres, L. van Bloois, M. I. Verstege, M. Ambrosini, H. Kalay, K. Nazmi, J. G. Bolscher, E. Hooijberg, T. D. de Gruijl, G. Storm, Y. van Kooyk, *J. Control. Rel.*, **2012**, *160*, 88-95.

Cu(I) entre azidas y alquinos (CuAAC)⁸⁸ y la adición tiol-eno entre tioles y grupos maleimida.¹⁹⁰

En la bibliografía, se encuentran descritos numerosos ejemplos de bioconjugación de péptidos *via* adición tiol-eno, mediante la introducción de cisteínas dentro de la secuencia peptídica.^{191,192,193,194} La cisteína es un aminoácido muy atractivo para la conjugación específica en una posición determinada ya que es relativamente poco común a lo largo de la proteómica y es fácil de introducir en un sitio específico de la cadena de aminoácidos. Este tipo de conjugaciones son completamente compatibles con los grupos funcionales característicos de la CuAAC (azidas y alquinos), lo cual permite la combinación de ambos en una misma estructura, comportándose como grupos ortogonales.

Por ello, se pretende diseñar plataformas que combinen grupos funcionales ortogonales que reaccionen por un lado, *via* adición de Michael de un grupo tiol de una cisteína al doble enlace de un grupo maleimida y por otro, *via* cicloadición 1,3-dipolar entre un grupo azida y un triple enlace.

3.3. Síntesis de Glicodendropéptidos (GDPs) como Plataforma de Presentación Multivalente de Epítomos de Interés Biológico

Como primera aproximación para la síntesis de GDPs, se establecieron dos métodos distintos que permitieron llegar a sistemas de hasta 16 copias de péptido y 9 copias de carbohidrato, los cuales hemos denominado como *método directo* y *método indirecto* (Esquema 13).

¹⁹⁰ J. M. Langenhan, J. S. Thorson, *Curr. Org. Synth.*, **2005**, 2, 59-81.

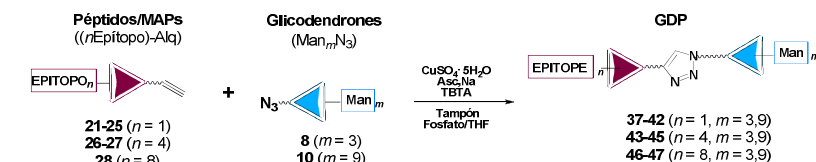
¹⁹¹ Y. Kim, S. O. Ho, N. R. Gassman, Y. Korlann, E. V. Landorf, F. R. Collart, S. Weiss, *Bioconjugate Chem.*, **2008**, 19, 786-791.

¹⁹² L. Ling, X. Li, Y. Watanabe, T. Akiyama, S. Ozaki, *Bioorg. Med. Chem.*, **1993**, 1, 155-159.

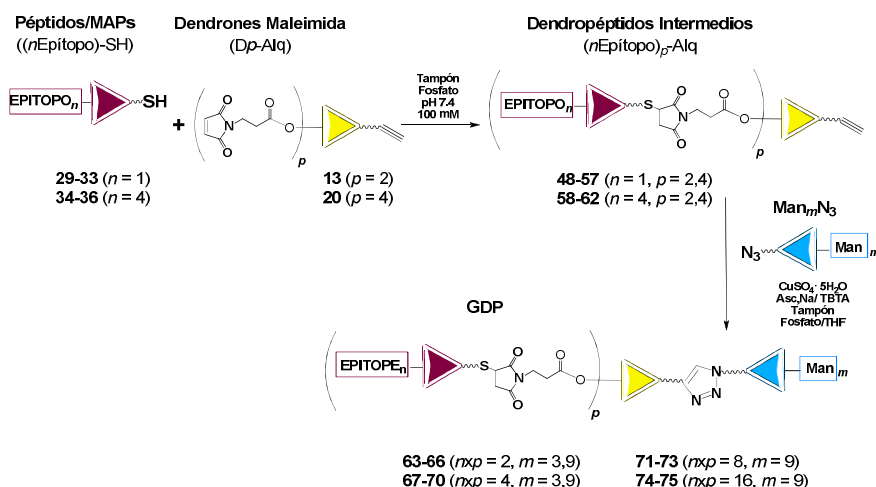
¹⁹³ B. Lebleu, H. M. Moulton, R. Abes, G. D. Ivanova, S. Abes, D. A. Stein, P. L. Iversen, A. A. Arzumanov, M. J. Gait, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2008**, 60, 517-529.

¹⁹⁴ K. Lu, Q.-P. Duan, L. Ma, D.-X. Zhao, *Bioconjugate Chem.*, **2010**, 21, 187-202.

Método directo



Método indirecto



Esquema 13. Representación esquemática de los métodos directo e indirecto para la síntesis de glicodendropéptidos de diferentes valencias.

En el *método directo* (Esquema 13), los epítomos peptídicos mono- ($n = 1$) o multivalentes ($n = 4, 8$) son conjugados directamente mediante CuAAC a glicodendrones de manosa para dar glicodendropéptidos con un máximo de 8 copias de péptido y 9 de carbohidrato.

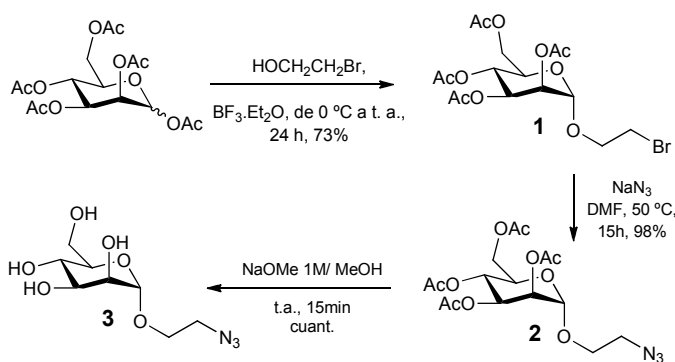
En el *método indirecto*, la adición tiol-eno se utiliza en un primer paso para anclar los péptidos o los MAPs a dendrones di- o tetravalentes de maleimida con un grupo alquino en la posición focal (Esquema 13). El dendropéptido intermedio resultante, se conjuga con los glicodendrones de manosa utilizando de nuevo CuAAC.

Para la formación de GDPs mediante cualquiera de ambos métodos, primero fue necesaria la síntesis y purificación de los distintos bloques de construcción (glicodendrones, dendrones de maleimida, péptidos y MAPs), funcionalizados adecuadamente para su posterior conjugación convergente.

3.3.1. Síntesis Convergente de los Glicodendrones de Manosa Tri- y Nonavalentes (Man_mN_3) mediante CuAAC

Para abordar la síntesis de los glicodendrones, se pensó que la cicloadición 1,3-dipolar entre azidas y alquinos podría ser una buena herramienta tanto para su construcción, utilizando manosa desprotegida y bloques de crecimiento sencillos, como para su posterior conjugación a biomoléculas de interés terapéutico. Como estrategia, se decidió seguir una ruta convergente, empleando núcleos de crecimiento sencillos que permitiesen llegar a intermedios comunes en la síntesis de las diferentes generaciones de glicodendrones.

Siguiendo la metodología puesta a punto en nuestro laboratorio,¹²⁷ se decidió utilizar como unidad de carbohidrato una manosa funcionalizada en su posición anomérica con un espaciador provisto de un grupo azida (**3**).

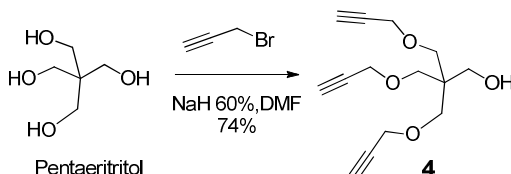


Esquema 14. Síntesis del derivado de manosa desprotegido **3** con un espaciador en su posición anomérica funcionalizado con un grupo azida.

Este derivado **3** se preparó en tres etapas con buenos rendimientos a partir de la correspondiente manosa peracetilada comercial. La primera etapa consistió en la glicosidación de ésta usando como aceptor de glicosilo el 2-bromoetanol y como promotor $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, obteniéndose el derivado glicosilado **1** con buenos rendimientos (Esquema 14). Este compuesto se caracterizó por ^1H -RMN, comprobándose la formación exclusiva del anómero α mediante el análisis de la constante de acoplamiento del protón anomérico ($J_{1,2} = 1.5 \text{ Hz}$). La siguiente etapa consistió en la sustitución del bromo del extremo terminal del espaciador por un grupo azida. Esta etapa se llevó a cabo en DMF a 50°C obteniéndose el derivado **2**, el cual se caracterizó por ^{13}C -RMN observándose la desaparición de la señal a 30.4 ppm correspondiente al metileno unido al Br y la aparición de una nueva señal a 50.5 ppm (metileno en α al grupo azida).

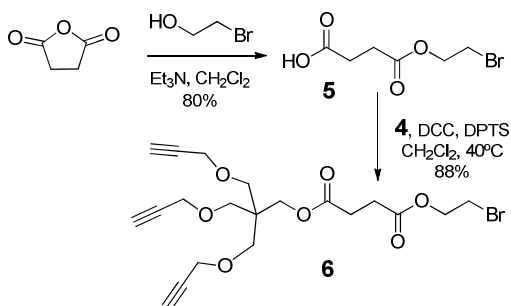
A continuación, se eliminaron los grupos acetato utilizando condiciones de Zemplén (NaOMe/MeOH)¹⁹⁵ para obtener el derivado de manosa **3** de manera cuantitativa.

Como núcleo de crecimiento, se decidió emplear un compuesto derivado del pentaeritritol comercial, conteniendo grupos alquino y una posición libre para su posterior conjugación con un espaciador fácilmente funcionalizable (compuesto **4**, Esquema 15). Para su síntesis, se utilizaron las condiciones descritas en la bibliografía,¹⁹⁶ obteniéndose el alcohol trispropargílico **4**¹⁹⁷ con buenos rendimientos.



Esquema 15. Síntesis del núcleo trivalente de pentaeritritol **4** con un grupo hidroxilo libre para su posterior funcionalización con un espaciador adecuado.

Posteriormente, el grupo hidroxilo libre se hizo reaccionar con un espaciador funcionalizado con un bromo en uno de sus extremos (**5**) utilizando condiciones clásicas de formación de ésteres: diciclohexilcarbodiimida (DCC), *p*-toluensulfonato de dimetilaminopiridinio (DPTS) y CH₂Cl₂ como disolvente (Esquema 16). El espaciador **5** fue preparado fácilmente a partir de la apertura del anillo del anhídrido succínico con 2-bromoetanol en presencia de Et₃N, usando como disolvente CH₂Cl₂. Ambos pasos transcurrieron con buenos rendimientos, dando lugar a la obtención del núcleo de crecimiento **6**.



Esquema 16. Síntesis del núcleo de crecimiento **6**.

¹⁹⁵ G. Zemplén, *Chem. Ges.*, **1927**, 60, 1555-1564.

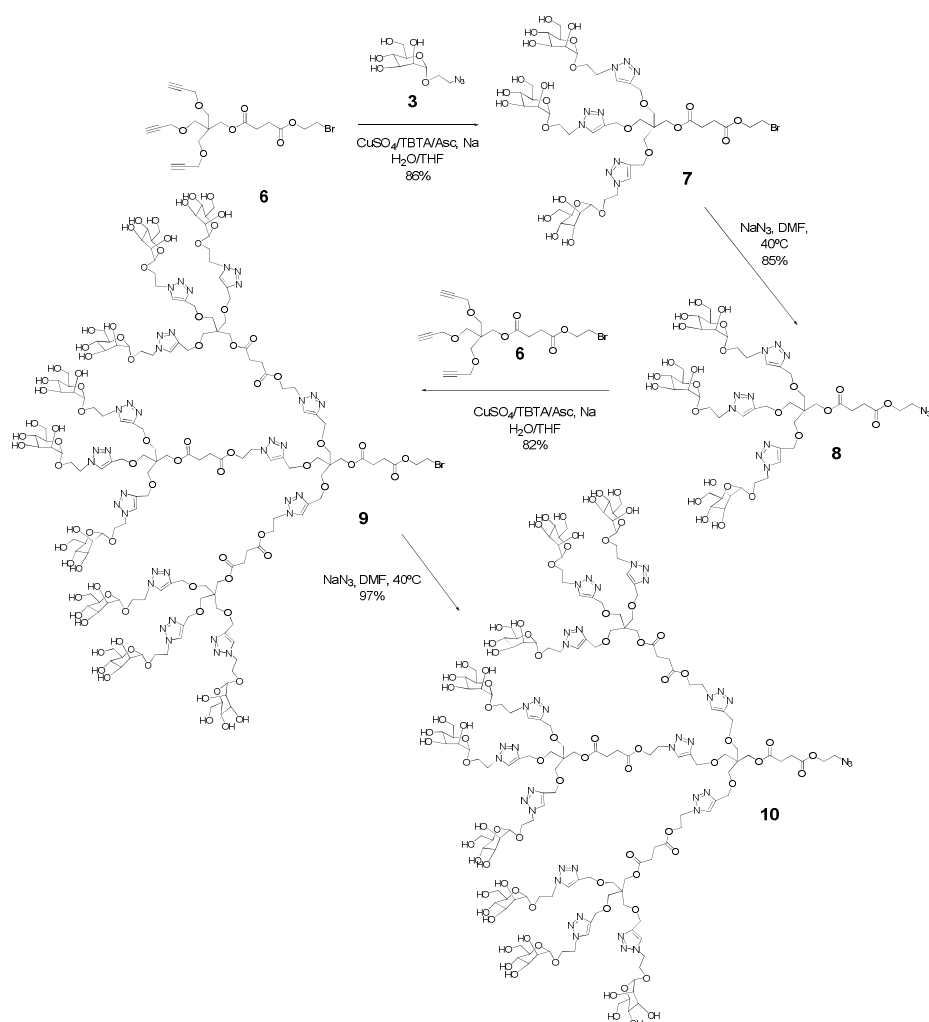
¹⁹⁶ H. Al-Mughaid, T. B. Grindley, *J. Org. Chem.*, **2006**, 71, 1390-1398.

¹⁹⁷ J. Zhu, X. Zhu, E. T. Kang, K. G. Neoh, *Polymer*, **2007**, 48, 6992-6999.

Este bromoderivado **6** con tres grupos alquino y con un grupo Br en su posición focal, es un intermedio clave en la síntesis del glicodendrón nonavalente (Esquema 17).

Una vez sintetizado dicho intermedio, se hizo reaccionar mediante CuAAC con 3 copias del derivado de manosa **3** (Esquema 17). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente utilizando $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ como fuente de cobre, ascorbato sódico para reducir *in situ* el Cu^{2+} a Cu^+ , y tris[(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina (TBTA), como ligando estabilizante de Cu^+ . Como disolvente, se empleó una mezcla de THF/ H_2O en una proporción 1:1 (v/v). Estas condiciones se habían puesto a punto previamente en nuestro laboratorio para la síntesis de glicodendrimeros de diferente valencia a partir de carbohidratos desprotegidos. Se observó que la reacción no tenía lugar si no se adicionaba TBTA, probablemente debido al elevado número de grupos hidroxilo capaces de quelar el cobre. Este ligando fue descrito y sintetizado por el grupo de Sharpless, como estabilizante del Cu^+ frente a la oxidación, aumentando así la actividad catalítica del metal.¹⁹⁸

¹⁹⁸ T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.*, **2004**, 6, 2853-2855.



Esquema 17. Ruta sintética basada en CuAAC para la obtención de los glicodendrones 8 y 10 con 3 y 9 manosas, respectivamente.

Una vez finalizada la reacción, el cobre se extrajo del medio por adición de la resina QuadraSil[®] MP. Tras varios minutos en agitación, dicha resina se filtró y se procedió a la purificación del crudo mediante cromatografía de exclusión de tamaño LH-20 (MeOH, 100%). El derivado trivalente 7 se obtuvo con buen rendimiento. La completa funcionalización del núcleo se corroboró mediante la correcta integración de las señales características en el correspondiente espectro de ¹H-RMN y por espectrometría de masas (Figura 44).

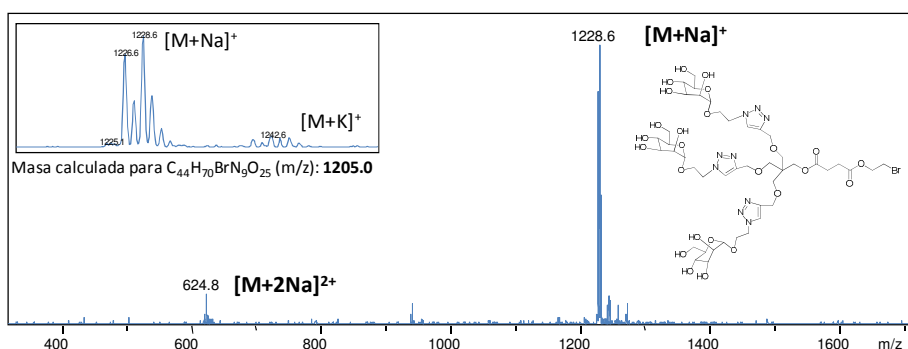


Figura 44. Espectro de masas (ESI) del glicodendrón trivalente 7.

La sustitución del bromo por un grupo azida se llevó a cabo a 40°C con NaN_3 en DMF anhidra, dando lugar a la formación del glicodendrón trivalente 8 con buenos rendimientos (85%). La total desaparición del Br se comprobó tanto por espectrometría de masas (ESI) como por 1H -RMN, observándose el desplazamiento de las señales de los protones del grupo metileno en β de 4.38 a 4.16 ppm, en una zona limpia del espectro (Figura 45).

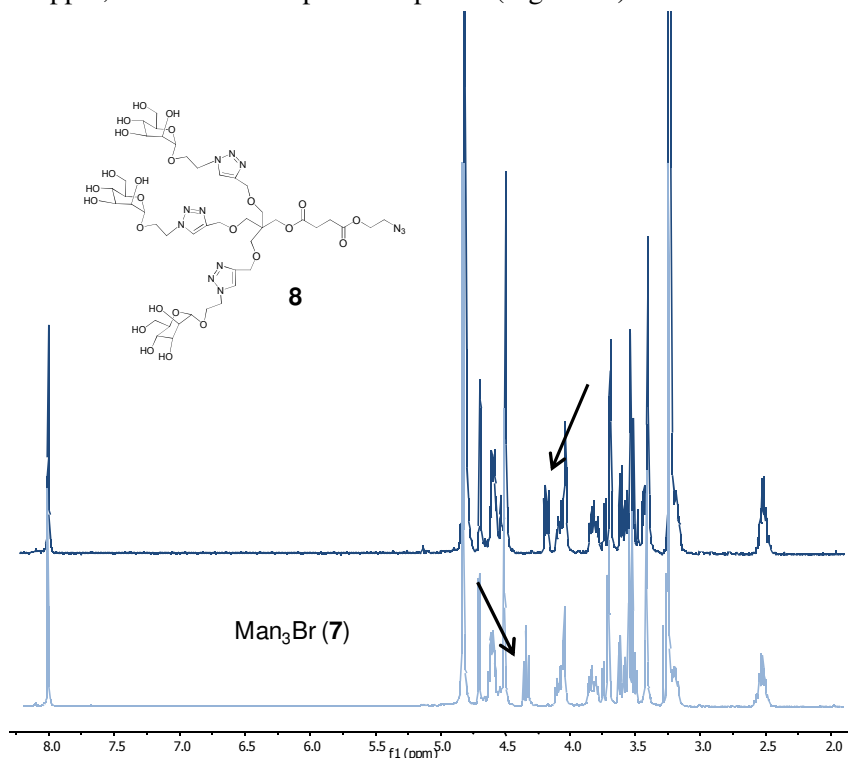


Figura 45. Espectros de 1H -RMN (400 MHz, CD_3OD) de los glicodendrones 7 (abajo) y 8 (arriba), en donde se observa el desplazamiento de las señales de los protones del metileno en β , de 4.38 (en β al Br) a 4.16 (en β a N_3) ppm.

El glicodendrón trivalente **8** está convenientemente funcionalizado para ser utilizado en la preparación de la siguiente generación por reacción con el núcleo **6** mediante CuAAC. Para este fin, se utilizaron 1.2 equivalentes de **8** por cada grupo alquino del núcleo **6** y se hicieron reaccionar mediante cicloadición 1,3-dipolar, para dar el intermedio nonavalente **9** (Esquema 17). La sustitución del Br por azida empleando las mismas condiciones descritas para la generación anterior dio lugar al glicodendrón **10** con buen rendimiento tras purificación mediante cromatografía de exclusión por tamaño G-25 (H₂O/MeOH, 9:1). La monodispersidad y la integridad de este compuesto se demostraron satisfactoriamente mediante ¹H-RMN (Figura 46) y espectrometría de masas (Figura 47).

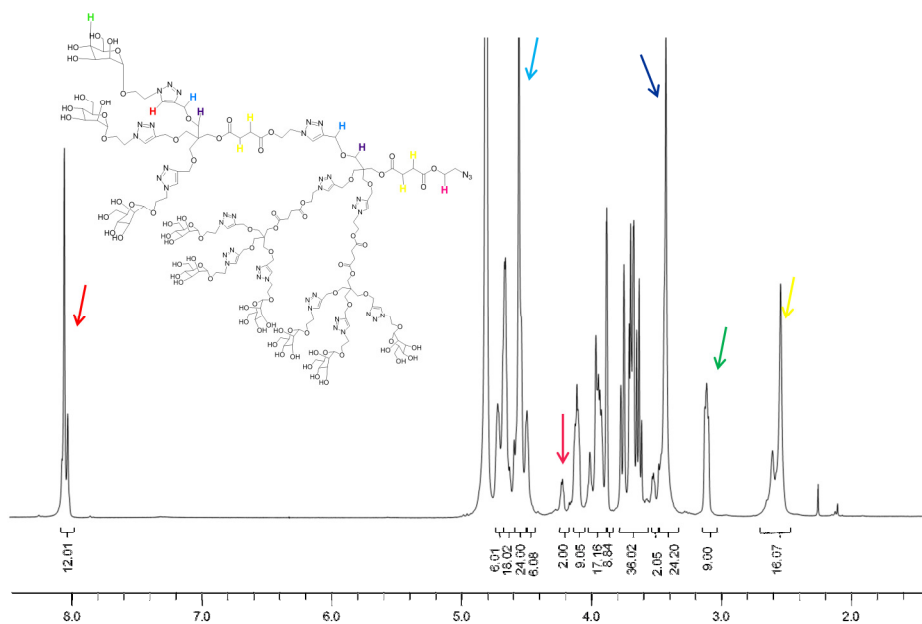


Figura 46. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, D₂O) del glicodendrón nonavalente **10**.

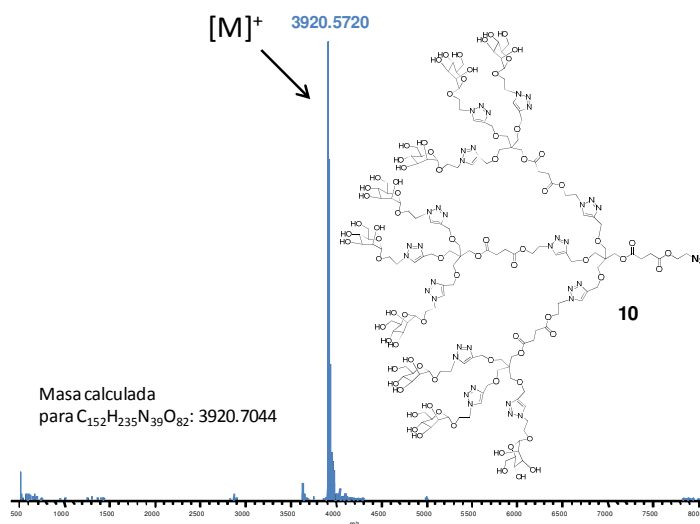


Figura 47. Caracterización del glicodendrón **10** mediante espectrometría de masas ESI de alta resolución.

Aunque la estrategia sintética descrita permite llegar a dendrones de mayor generación, el sistema con 9 copias de manosa parece un buen candidato como prueba de concepto de nuestra estrategia sintética para obtener GDPs.

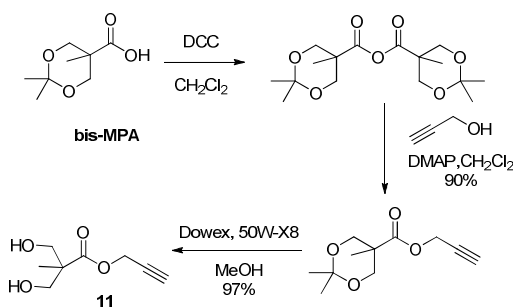
3.3.2. Síntesis de Dendrones Maleimida (D_p Alq)

3.3.2.1. Síntesis del Dendrón Divalente D_2 -Alq (**13**)

Para la síntesis del dendrón divalente de maleimida se partió del compuesto **11** (Esquema 18), previamente preparado en nuestro laboratorio y descrito en la bibliografía.¹⁹⁹ Este diol se sintetizó a partir del anhídrido del ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico (bis-MPA) con los grupos hidroxilo protegidos como isopropilidenacetal.²⁰⁰ Para ello, éste se hizo reaccionar con el alcohol propargílico en una mezcla de CH_2Cl_2 /Piridina en presencia de dimetilaminopiridina (DMAP). Tras purificación mediante cromatografía en gel de sílice, se desprotegieron los grupos hidroxilo con la resina DOWEX 50W-X8, obteniéndose el compuesto divalente **11** provisto de un alquino en su posición focal.

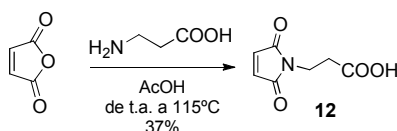
¹⁹⁹ P. Wu, M. Malkoch, J. N. Hunt, R. Vestberg, E. Kaltgrad, M. G. Finn, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, C. J. Hawker, *Chem. Commun.*, **2005**, 0, 5775-5777.

²⁰⁰ M. Malkoch, E. Malmström, A. Hult, *Macromolecules*, **2002**, 35, 8307-8314.



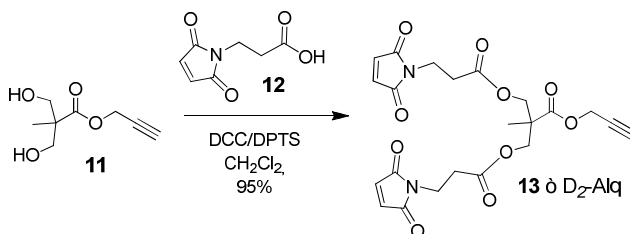
Esquema 18. Formación del dendrón **11**.

Posteriormente, se procedió a la síntesis del ácido 3-maleimido propiónico (**12**) a partir de anhídrido maleico y β -alanina, utilizando las condiciones descritas en la bibliografía (Esquema 19).²⁰¹



Esquema 19. Síntesis del ácido 3-maleimidopropiónico (**12**).

La reacción entre el 2,2-bis(hidroximetil)propionato de propargilo (**11**) y el ácido 3-maleimido propiónico (**12**), se llevó a cabo empleando diciclohexilcarbodiimida (DCC) como reactivo de acoplamiento, y 4-toluensulfonato de dimetilaminopiridinio (DPTS) (Esquema 20).²⁰² La formación del dendrón divalente **13**, transcurrió con excelente rendimiento, tras purificación mediante cromatografía en gel de sílice.



Esquema 20. Síntesis del dendrón maleimida divalente (**13** ò D_2 -Alq).

Mediante ^1H -RMN, se pudieron observar claramente las señales del grupo maleimida como por ejemplo, los dos tripletes pertenecientes a los grupos

²⁰¹ G. Mantovani, F. Lecolley, L. Tao, D. M. Haddleton, J. Clerx, J. J. L. M. Cornelissen, K. Velonia, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 2966-2973.

²⁰² J. S. Moore, S. I. Stupp, *Macromolecules*, **1990**, 23, 65-70.

metileno a 2.65 y 3.81 ppm, así como el singlete característico de los protones olefínicos a 6.71 ppm. La correcta integración de dichas señales con respecto a las típicas del fragmento del diol **11**, demostraron la completa funcionalización del núcleo de crecimiento (Figura 48).

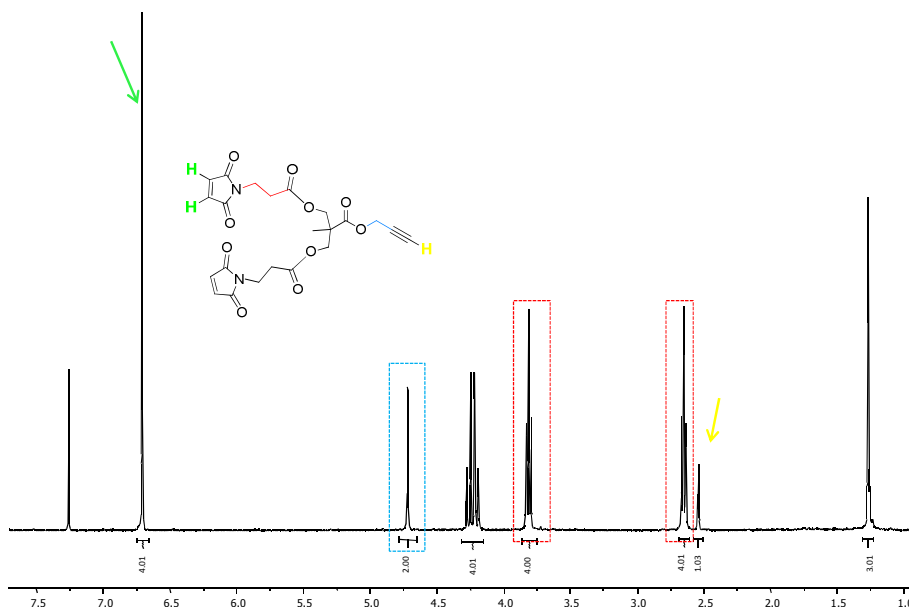
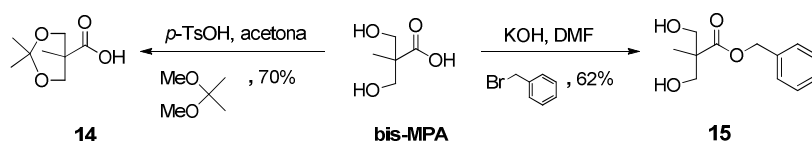


Figura 48. Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) del dendrón de maleimida divalente **13**.

3.3.2.2. Síntesis del Dendrón Tetravalente D₄-Alq (**20**)

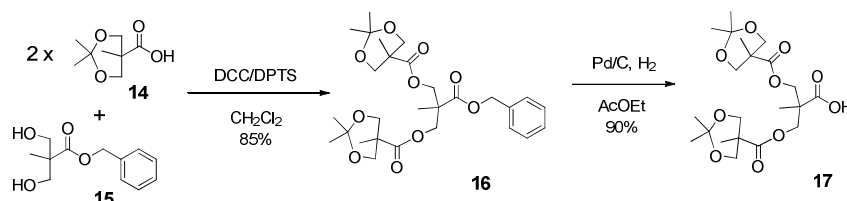
Para la síntesis del dendrón tetravalente de maleimida, se empleó la metodología puesta a punto por Fréchet y colaboradores,²⁰³ basada en el ácido bis-MPA. Así, por un lado se protegió el grupo carboxílico como bencilo y por otro, los grupos hidroxilo se protegieron como isopropilidenacetal (Esquema 21). Para la protección de los grupos hidroxilo se usó 2,2-dimetoxipropano y ácido *p*-toluensulfónico (*p*-TsOH) como catalizador. La aparición de dos singletes a 1.41 y 1.44 ppm, en el espectro de ¹H-RMN, confirmó la formación del compuesto **14**. Por otra parte, para la bencilación se usó KOH como base y bromuro de bencilo como agente alquilante, dando lugar al compuesto **15**, cuya estructura se confirmó por ¹H-RMN, donde se observaron las señales características del grupo bencilo a 5.21 y 7.36 ppm.

²⁰³ H. Ihre, A. Hult, J. M. J. Fréchet, I. Gitsov, *Macromolecules*, **1998**, *31*, 4061-4068.



Esquema 21. Formación de los bloques de construcción **14** y **15** para el sistema tetravalente basado en bis-MPA.

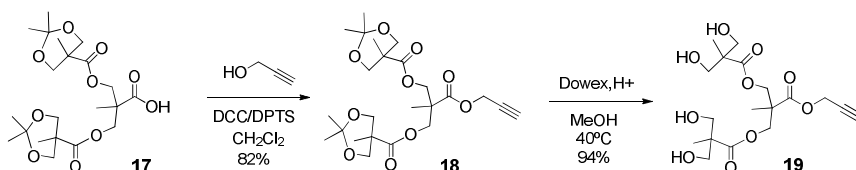
Una vez obtenidos los compuestos **14** y **15**, se acoplaron entre sí usando DCC y DPTS en CH_2Cl_2 (Esquema 22). Este acoplamiento condujo al compuesto **16** que, tras purificación por cromatografía en columna de gel de sílice, se caracterizó por ^1H -RMN observándose las señales características para este compuesto, así como la correcta integración de los grupos metilo del dimetilacetilal (a 1.39 y 1.42 ppm, 6H cada uno) con respecto a las señales del grupo bencilo (5.19 y 7.36 ppm, 2H y 5H, respectivamente).



Esquema 22. Síntesis del ácido **17** con los grupos hidroxilo protegidos.

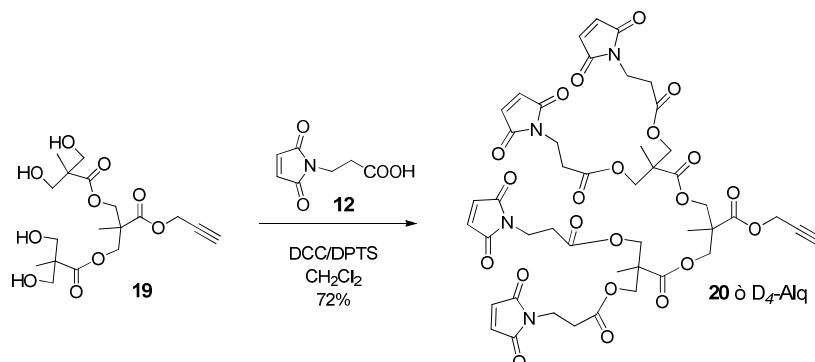
El siguiente paso fue la desprotección selectiva del grupo bencilo, mediante hidrogenación catalítica usando Pd(C) en atmósfera de H_2 (4 Bar), obteniéndose el compuesto **17** con buen rendimiento (Esquema 22).

Posteriormente, este ácido **17** se funcionalizó con un grupo alquino en su posición focal mediante la formación de un enlace éster con el alcohol propargílico, utilizando la misma metodología empleada hasta ahora (Esquema 23). A continuación, empleando las condiciones descritas anteriormente, se desprotegieron los grupos hidroxilo, dando lugar a la formación del compuesto **19** con muy buenos rendimientos y sin necesidad de purificación por cromatografía en columna.



Esquema 23. Formación del tetrol **19**.

Por último, se llevó a cabo la funcionalización del dendrón tetravalente con grupos maleimida, para lo cual se hizo reaccionar el compuesto **19** con el ácido 3-maleimido propiónico (**12**), en presencia de DCC y DPTS (Esquema 24). Tras purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice, se obtuvo el dendrón maleimida **20** (D_4 -Alq) con buenos rendimientos.



Esquema 24. Síntesis del dendrón maleimida **20** (D_4 -Alq) mediante reacción del ácido 3-maleimidopropiónico y el tetrol **19**.

La integración de las señales de los protones olefínicos de la maleimida a 6.72 ppm con respecto al triplete característico del CH propargílico a 2.54 ppm dio lugar a una relación de 8:1, demostrando la completa funcionalización del compuesto **19** con cuatro grupos maleimida (Figura 49). Asimismo, se llevó a cabo la caracterización mediante ^{13}C -RMN y espectrometría de masas, verificando la obtención de dicho dendrón de manera monodispersa.

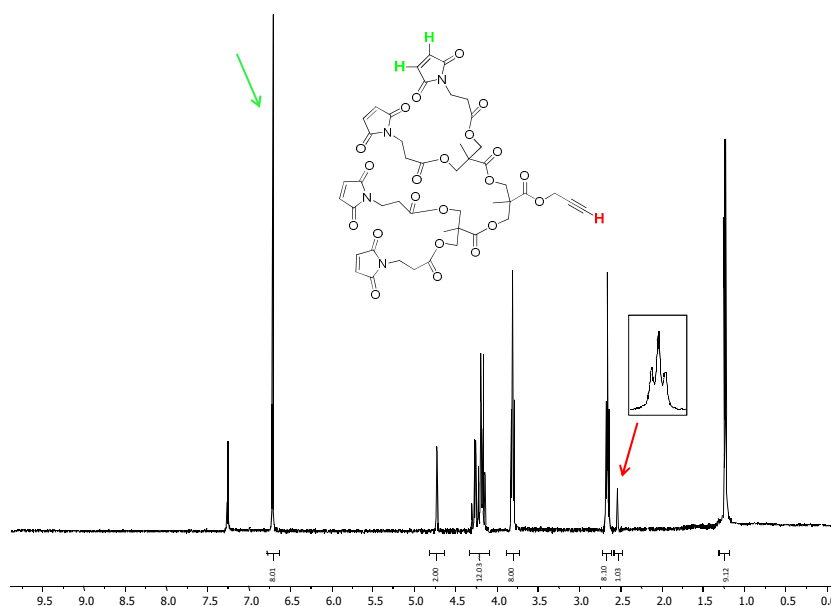
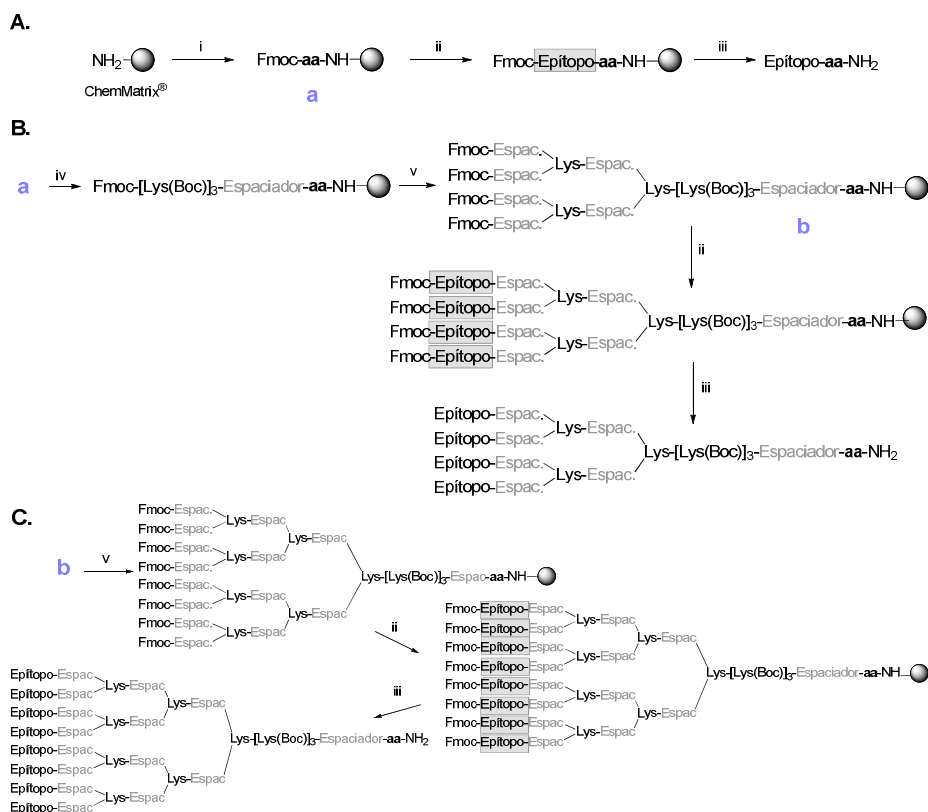


Figura 49. Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) para el dendrón de maleimida tetravalente **20**. En él se observa la correcta integración de los protones olefinicos (6.72 ppm) con respecto al triplete característico del CH propargílico (2.54 ppm).

3.3.3. Preparación de Péptidos y MAPs Utilizando Síntesis en Fase Sólida (SPPS)

La síntesis de los péptidos y los MAPs, así como su posterior conjugación a los dendrones anteriormente comentados (**8**, **10**, **13** y **20**) para dar lugar a los glicodendropéptidos finales, se llevaron a cabo durante una estancia breve en el laboratorio del Profesor David Andreu en el Departamento de Ciencias Experimentales y de la Salud de la Universitat Pompeu Fabra/PRBB de Barcelona.

Tanto los péptidos como los MAPs utilizados para la construcción de nuestros sistemas GDPs, fueron sintetizados en fase sólida (SPPS) automatizada usando *protocolos Fmoc*, tal y como se puede ver en el esquema 25. De esta forma se prepararon las estructuras peptídicas en forma mono-, tetra- e incluso octavalente.



Esquema 25. Síntesis directa o divergente de péptidos y MAPs de diferentes valencias, mediante SPPS automatizada. Todos los pasos excepto (iii) requieren desprotección y acoplamiento mediante protocolos Fmoc. (i) Fmoc-aa; (ii) Fmoc-O₂Oc o Fmoc-Ahx (espaciadores protegidos, ver a continuación) y después los ciclos oportunos de SPPS para dar lugar a la secuencia peptídica deseada. El rectángulo sombreado indica la versión del epítipo con las cadenas laterales protegidas; (iii) acidólisis con TFA; (iv) Fmoc-O₂Oc/Ahx y 3 × Fmoc-Lys(Boc); (v) Fmoc-Lys(Fmoc) y Fmoc-O₂Oc/Ahx.

Para la síntesis de estos sistemas peptídicos se utilizó la resina comercial Rink-amide ChemMatrix, a la cual se le adicionó de manera automática o manual el residuo (aa) responsable de la conjugación en la posterior preparación de GDPs: bishomopropargilglicina (Bpg) o cisteína (Cys) (Figura 50).

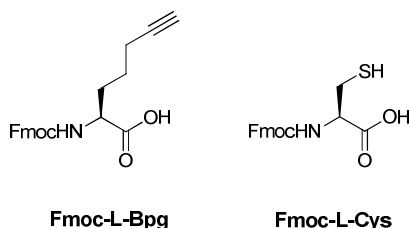


Figura 50. Aminoácidos responsables de la conjugación con los dendrones preparados en el laboratorio de Sevilla para formar GDPs, tanto por el método directo (Bpg), como por el indirecto (Cys).

Para el *método directo* se empleó un aminoácido no natural en la síntesis de péptidos y MAPs, la *bishomopropargilglicina* (Bpg). Este aminoácido se encuentra disponible comercialmente con su posición amino protegida con un grupo Fmoc. La Fmoc-Bpg se cargó sobre la resina de manera manual, utilizando condiciones clásicas de formación de enlace amida, HBTU (hexafluorofosfato de *O*-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio) y HOBt (*N*-hidroxibenzotriazol) en DMF, usando DIPEA (*N,N'*-diisopropiletilamina) como activante. Sin embargo, para el *método indirecto*, los sistemas peptídicos se prepararon con una cisteína en sus extremos, la cual se unió a la resina de manera automática empleando condiciones descritas en la literatura.¹⁵⁷

Para la síntesis de los MAPs se siguió la metodología divergente puesta a punto por el grupo del Profesor Andreu,^{157,164,204} en la que se introducen espaciadores de diferente naturaleza en todos los puntos de ramificación para mejorar la calidad del producto final (Esquema 25). Para nuestros MAPs, se emplearon dos tipos de espaciadores: el ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico (O₂Oc) y el ácido 6-aminohexanoico (Ahx). Estos espaciadores se encuentran disponibles comercialmente con su grupo amino protegido en forma de Fmoc, tal y como se representan en la siguiente figura.

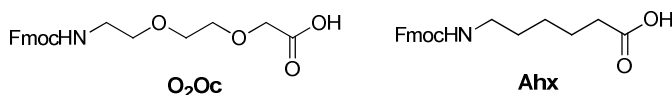


Figura 51. Estructura de los espaciadores empleados para aumentar la flexibilidad del esqueleto del MAP en los puntos de ramificación. Estos compuestos tienen su posición NH₂ protegida con un grupo Fmoc.

²⁰⁴ P. Vepřek, J. Ježek, *J. Pept. Sci.*, **1999**, 5, 203-220.

Al residuo (Bpg o Cys) cargado sobre la resina (**a**. Esquema 25), se le hizo reaccionar con el espaciador oportuno mediante SPPS automatizada. A continuación, se adicionaron tres residuos Fmoc-Lys(Boc) para aumentar la distancia entre la posición focal y la de crecimiento. La elongación y ramificado con Fmoc-Lys(Fmoc) y Fmoc-O₂Oc/Ahx, tal y como se observa en el esquema 25, dio lugar a la resina tetravalente **b**. Ésta, se hizo crecer con cuatro copias de la secuencia peptídica oportuna en cada caso, tras lo cual se desancló de la resina mediante acidolisis en presencia de TFA, H₂O y triisopropilsilano en proporción 95:2.5:2.5 (v/v), para dar lugar a los correspondientes MAPs tetravalentes tras purificación por HPLC en fase reversa. Todos los sistemas peptídicos se obtuvieron de forma homogénea (pureza por HPLC > 95%), corroborándose mediante espectrometría de masas (Ver tablas 2 y 3).

Para la síntesis del sistema octavalente, se partió de la resina tetravalente **b** (Esquema 25) empleando los mismos ciclos de síntesis, desanclado/desprotección y purificación, descritos para los sistemas anteriores.

Utilizando esta metodología se sintetizaron 16 sistemas peptídicos (péptidos monovalentes y MAPs), recogidos en las tablas 2 y 3. Dada la complejidad de estas síntesis, los rendimientos fueron de moderados a bajos, siendo el peor el correspondiente a la síntesis del MAP octavalente **28** (7%). Como epítomos se emplearon los descritos anteriormente, cuyas secuencias (*N*→*C*) se exponen a continuación:

- sM2e: EVETPTRNEWES
- M2e: MSLLTEVETPTRNEWESRSSDSSD
- NP₃₆₆₋₃₇₄: ASNENMETM
- OT1: SIINFEKL
- OT2: ISQAVHAAHAEINEAGR

Compuesto	Nomenclatura abreviada (Epítipo)	PM [mo/av] calculado	PM encontrado
21	sM2e-Alq (EVETPTRNEWES)	1597.7372/1598.6684	1597.8374
22	M2e-Alq (MSLLTEVETPTRNEWESR SSDSSD)	2877.3087/2879.0306	2880.0214
23	NP ₃₆₆₋₃₇₄ -Alq (ASNENMETM)	1148.2674/1147.4638	1148.4704
24	OT1-Alq (SIINFEKL)	1085.6/1086.3	1086.2
25	OT2-Alq (ISQAVHAAHAEINEAGR)	1896.0/1897.1	1898.3
26	4sM2e(O ₂ Oc)-Alq (EVETPTRNEWES)	7754.6784/7759.1674	7755.7797
27	4NP ₃₆₆₋₃₇₄ (Ahx)-Alq (ASNENMETM)	5729.7285/5733.6579	5735.6895
28	8sM2e(O ₂ Oc)Alq (EVETPTRNEWES)	15258.1457/15266.9637	15258.2932

Tabla 2. Péptidos y MAPs sintetizados mediante SPPS con un Bpg terminal para su posterior conjugación con glicodendrimeros mediante el método directo.

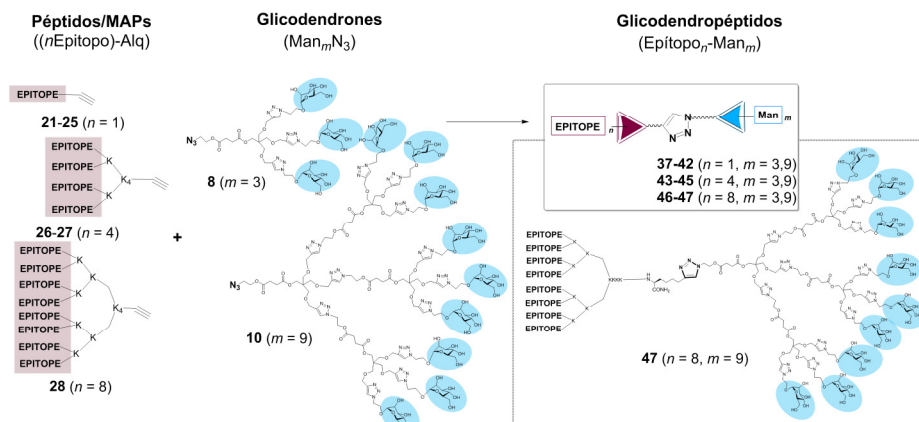
Compuesto	Nomenclatura abreviada (Epítipo)	PM [mo/av] calculado	PM encontrado
29	sM2e-SH (EVETPTRNEWES)	1577.6780/1578.6589	1578.9452
30	M2e-SH (MSLLTEVETPTRNEWESRSSDSSD)	2857.2495/2859.0211	2859.2907
31	NP ₃₆₆₋₃₇₄ -SH (ASNENMETM)	1128.2579/1127.4046	1128.4105
32	OT1-SH (SIINFEKL)	1065.5/1066.3	1066.8
33	OT2-SH (ISQAVHAAHAEINEAGR)	1875.9/1877.1	1873.7
34	4sM2e(Ahx)-SH (EVETPTRNEWES)	7269.6/7273.9	7274.3
35	4M2e(Ahx)-SH (MSLLTEVETPTRNEWESRSSDSSD)	12387.9/12395.4	12481.5
36	4NP ₃₆₆₋₃₇₄ (O ₂ Oc)-SH (ASNENMETM)	5660.4292/5664.3112	5660.1839

Tabla 3. Péptidos y MAPs sintetizados mediante SPPS con una Cys terminal para su posterior conjugación con dendrones maleimida mediante el método indirecto.

3.3.4. Síntesis de GDPs Mediante el Método Directo

En el *método directo*, se conjugaron péptidos mono-, tetra- y hasta octavalenes con glicodendrones de 3 y 9 manosas, mediante una única reacción *click* (CuAAC), tal y como se puede observar en el esquema 26.

Mediante esta metodología, se sintetizaron los GDPs **37-47**, siendo el de mayor peso molecular este último, representado esquemáticamente a continuación.



Esquema 26. Síntesis de GDPs mediante el método directo. Representación esquemática del GDP de mayor tamaño (compuesto **47**), con 8 copias de péptido (en este caso, sM2e) y 9 de carbohidrato.

Para poner a punto las condiciones *click* para la conjugación directa de los sistemas peptídicos con los glicodendrones de manosa, se pensó en utilizar los compuestos más sencillos. Por ello, las primeras pruebas se hicieron con el glicodendrón trivalente **8** y las construcciones del epítipo sM2e (EVETPTRNEWES) que, aunque no tiene interés desde el punto de vista biológico, resulta un compuesto atractivo desde una perspectiva sintética dada su bien establecida preparación. En concreto, la optimización de las condiciones *click* se llevaron a cabo con el péptido monovalente **21**.

El glicodendrón **8**, en principio tampoco tendría un interés biológico, ya que desde nuestra experiencia y como se comentó anteriormente, es el dendrón nonavalente el que tienen el tamaño y la forma adecuados para ser internalizado a través de su interacción con DC-SIGN. Aún así, dado que su obtención requiere menos esfuerzo sintético, parecía un buen candidato para poner a punto la conjugación con péptidos o MAPs *via* CuAAC.

Entrada	Condiciones (eq./reactivos)	Disolvente	Temperatura	% Conversión
1	0.1 CuSO ₄ 0.2 TBTA 0.4 Asc,Na	H ₂ O/THF (1:1)	t.a.	0%
2	0.1 CuSO ₄ 0.2 TBTA 0.4 Asc,Na	H ₂ O/THF (1:1)	40°C	0%
3	0.4 CuSO ₄ 0.8 TBTA 1.6 Asc,Na	H ₂ O/THF (1:1)	t.a.	0%
4	0.4 CuSO ₄ 0.8 TBTA 1.6 Asc,Na	H ₂ O/THF (1:1)	40°C	0%
5	0.1 CuBr 0.2 TBTA	H ₂ O/THF (1:1)	t.a.→40°C	0%
6	0.1 CuBr 0.2 TBTA	H ₂ O/CH ₃ CN (1:1)	t.a.→40°C	0%
7	0.5 CuBr 1.0 TBTA	H ₂ O/THF (1:1)	t.a.→40°C	0%
8	0.1 CuSO ₄ 0.2 TBTA 0.4 Asc,Na	Tampón fosfato (33mM, pH 7.4)/ THF (2:3)	t.a.	25%
9	0.6 CuSO ₄ 1.2 TBTA 2.4 Asc,Na	Tampón fosfato (33mM, pH 7.4)/ THF (2:3)	t.a.	71%
10	1 CuSO ₄ 2 TBTA 4 Asc,Na	Tampón fosfato (33mM, pH 7.4)/ THF (2:3)	t.a.	100%

Tabla 4. Condiciones probadas para la conjugación entre sM2e-Alq (**21**) y Man₃N₃ (**8**).

De todas las condiciones probadas (Tabla 4), los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizó 1 equivalente de CuSO₄·5H₂O, 2 equivalentes de TBTA y 4 de ascorbato sódico, en una mezcla de THF/tampón fosfato (33mM, pH 7.4) 2:3 (v/v) como disolvente (entrada **10**, Tabla 4). El tampón fosfato parecía necesario para que se diese la reacción ya que el péptido aportaba cierto carácter ácido al medio, no permitiendo la formación del correspondiente triazol 1,4-disustituido. La relación de equivalentes entre glicodendrón y sistema peptídico fue de 1:1. Para las reacciones llevadas a cabo con el glicodendrón nonavalente **10**, se emplearon las mismas condiciones aunque en este caso, la proporción glicodendrón/sistema peptídico fue de 1:2. Los GPDs resultantes, con relaciones carbohidrato/péptido de 3:1, 3:4, 3:8, 9:1, 9:4 y 9:8, se purificaron mediante RP-HPLC semipreparativo y se caracterizaron por espectrometría de masas (ver Tabla 5).

La reproducibilidad y fiabilidad de las condiciones establecidas, permitieron la preparación de 11 GDPs diferentes (**37-47**) recogidos en la tabla 5, con conversiones prácticamente cuantitativas para todos los casos, lo cual se demostró mediante seguimiento de las reacciones por HPLC analítico. Sin embargo, dada la pequeña escala en la que se trabajó, los rendimientos obtenidos tras purificación fueron de bajos a moderados, en el rango del 35 al 50%.

Compuesto	Nomenclatura abreviada	Péptido/Manosa	PM [mo/av] (calculado)	PM (encontrado)
37	sM2e-Man ₃	1:3	2764.1948/2765.7604	2765.2102
38	sM2e-Man ₉	1:9	5516.2790/5519.3728	5519.3068
39	M2e-Man ₉	1:9	6795.9/6799.7	6799.0
40	NP ₃₆₆₋₃₇₄ -Man ₉	1:9	5066.0056/5068.9718	5069.0245
41	OT1-Man ₉	1:9	5004.1/5007.0	5004.5
42	OT2-Man ₉	1:9	5814.5/5817.8	5844.7
43	4sM2e-Man ₃	4:3	8921.1359/8926.2594	8926.2813
44	4sM2e-Man ₉	4:9	11673.2/11679.9	11679.3
45	4NP ₃₆₆₋₃₇₄ -Man ₉	4:9	9648.2703/9654.3623	9654.2948
46	8sM2e-Man ₃	8:3	16424.6/16434.1	16436.0
47	8sM2e-Man ₉	8:9	19176.7/19187.7	19190.0

Tabla 5. Glicodendropéptidos **37-47** sintetizados mediante el método directo.

Esta metodología permite la síntesis de moléculas tan complejas como el compuesto **47**, dando lugar a una conversión prácticamente cuantitativa desde los productos de partida al GDP correspondiente, tal y como se puede apreciar en la figura 52, donde se muestra el seguimiento de la reacción por HPLC. Tras purificación por RP-HPLC, se pudo observar un único pico en el espectro de masas (Figura 53).

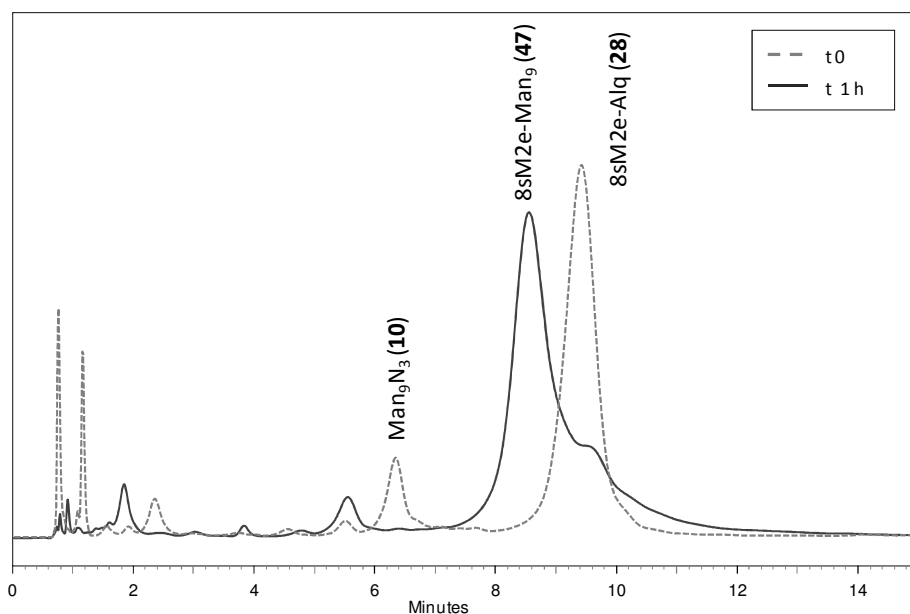


Figura 52. Seguimiento de la reacción del glicodendrón nonavalente **10** con el MAP **28**. En línea discontinua se observa la reacción a tiempo 0 y en línea continua tras 1 hora, con conversión prácticamente total, obteniéndose el correspondiente GDP **47** de manera monodispersa.

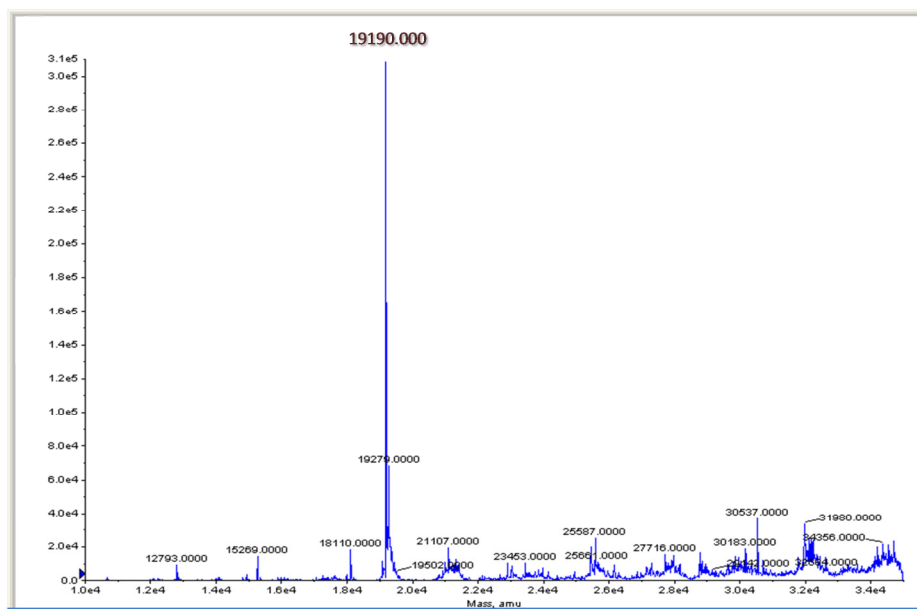
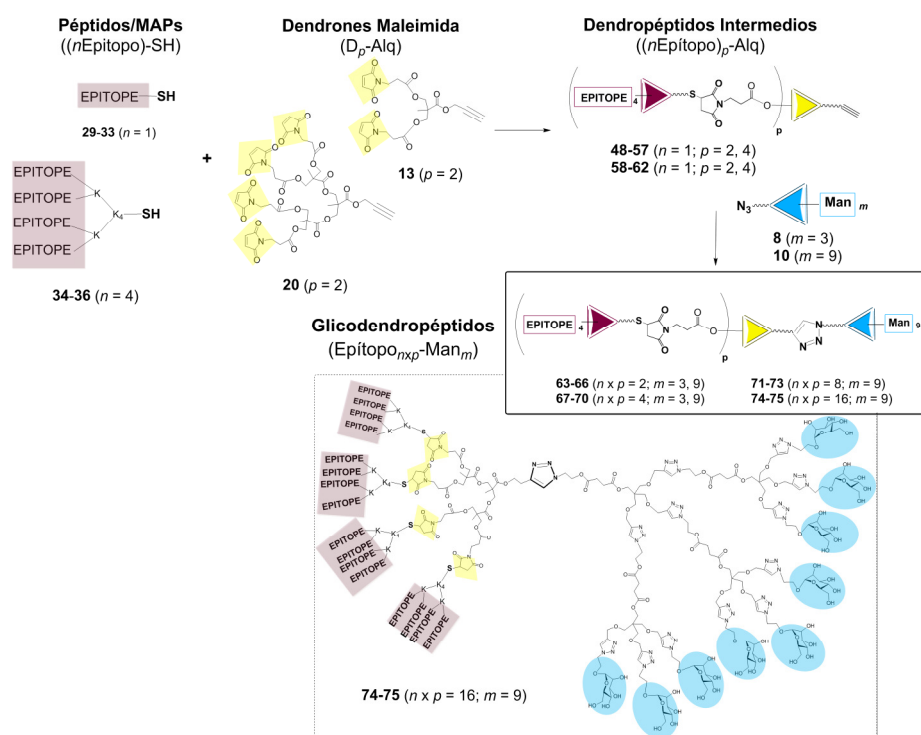


Figura 53. Espectro de masas (ESI) del GDP **47** tras purificación mediante RP-HPLC.

3.3.5. Síntesis de GDPs Mediante el Método Indirecto

El principal problema de la aproximación directa es que mediante SPPS es difícil llegar a sistemas de más de cuatro copias de péptido, especialmente para péptidos problemáticos como M2e. De hecho, sólo pudimos sintetizar el MAP octavalente para el caso del epítipo sM2e. Es por ello, que se ideó una estrategia convergente que permitiese llegar a multivalencias mayores a partir de bloques de construcción sencillos (Esquema 27).



Esquema 27. Síntesis de glicodendropéptidos mediante el método indirecto.

En esta estrategia los dendrones de maleimida **13** y **20**, con grupos alquino en sus posiciones focales, sirvieron por un lado como soportes para aumentar la multivalencia de la parte peptídica y por otro, como conexión con la parte de carbohidrato. Así, los péptidos o MAPs provistos con una cisteína terminal fueron conjugados quimiosselectivamente *via* adición de Michael para dar los peptidodendrones intermedios **48-62** (Esquema 27). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente en una mezcla de CH₃CN/Tampón fosfato (100 mM, pH 7.4) y los tiempos de reacción fueron desde pocos minutos hasta 48 horas, en función del impedimento estérico. Los intermedios así formados se purificaron mediante RP-HPLC semipreparativo o se utilizaron directamente,

en función del porcentaje de conversión con el que hubiese transcurrido la reacción. Así por ejemplo, para el caso del compuesto **48** el ajuste de las condiciones de reacción permitió obtener un único producto sin restos de material de partida (dendrón **13** o péptido **29**), pudiéndose utilizar en el siguiente paso sin purificación previa (Figura 54). Para eliminar los restos de sales y poder calcular el rendimiento, los intermedios así obtenidos se pasaron por una columna NAD-10.

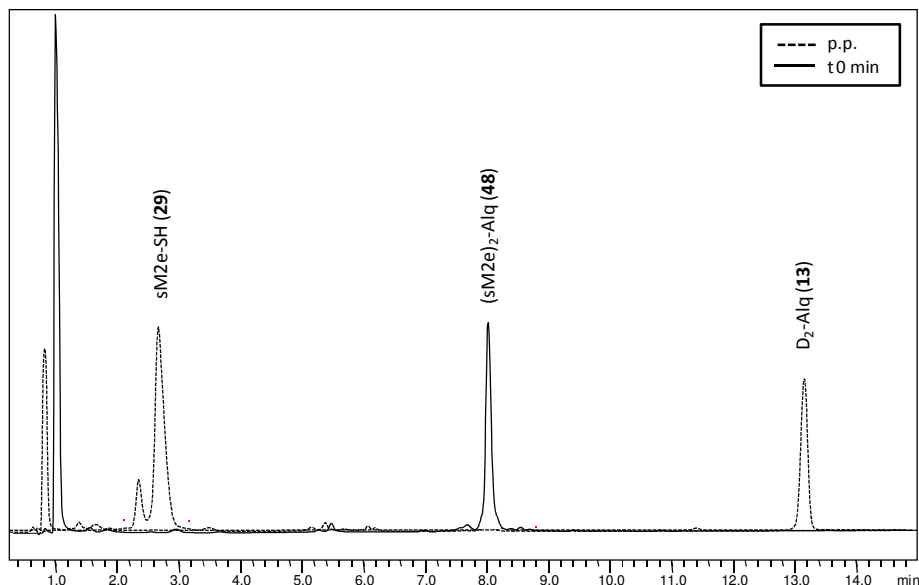


Figura 54. Seguimiento de la reacción entre el péptido **29** y el dendrón maleimida divalente **13**. En línea discontinua se representan los productos de partida (p.p.) antes de la conjugación. Se puede observar la formación inmediata ($t = 0$ min) del producto final **48** (línea continua) con un porcentaje de conversión del 100%, pudiéndose utilizar en el paso siguiente sin purificación previa.

En este primer paso se sintetizaron los dendropéptidos intermedios **48-62** con excelentes porcentajes de conversión, confirmándose satisfactoriamente la formación de los mismos mediante espectrometría de masas (Tabla 6).

Compuesto	Nomenclatura abreviada	Número de epítomos ($n \times p$)	PM [mo/av] (calculado)	PM (encontrado)
48	(sM2e) ₂ -Alq	2	3629.4835/3631.7352	3531.4192
49	(sM2e) ₄ -Alq	4	7319.0/7323.5	7319.0
50	(M2e) ₂ -Alq	2	6188.6263/6192.4596	6191.8254
51	(M2e) ₄ -Alq	4	12437.3/12445.0	12444.3
52	(NP ₃₆₆₋₃₇₄) ₂ -Alq	2	2728.9/2730.9	2729.9
53	(NP ₃₆₆₋₃₇₄) ₄ -Alq	4	5517.8943/5521.9184	5522.8911
54	(OT1) ₂ -Alq	2	2607.3/2609.0	2608.3
55	(OT1) ₄ -Alq	4	5274.5/5278.0	5275.9
56	(OT2) ₂ -Alq	2	4227.9/4230.5	4222.3
57	(OT2) ₄ -Alq	4	8515.9/8521.1	8495.8
58	(4sM2e) ₂ -Alq	8	15013.3/15022.3	15022.3
59	(4sM2e) ₄ -Alq	16	30086.6/30104.6	30113.0
60	(4M2e) ₂ -Alq	8	25249.9/25265.2	25304.0
61	(4NP) ₂ -Alq	8	11795.0/11803.0	11796.0
62	(4NP) ₄ -Alq	16	23645.0/23666.1	23666.0

Tabla 6. Dendropéptidos intermedios sintetizados en la primera etapa del método indirecto.

Como se puede observar en la tabla, mediante este método indirecto se llegaron a obtener dendropéptidos de hasta 16 copias de epítopo, en este caso sM2e y NP₃₆₆₋₃₇₄. Si bien es cierto, que estas reacciones transcurrían con tiempos de reacción largos y moderados porcentajes de conversión (Figura 55), los productos obtenidos eran claramente monodispersos tal y como se puede observar en el espectro de masas de la figura (Figura 56).

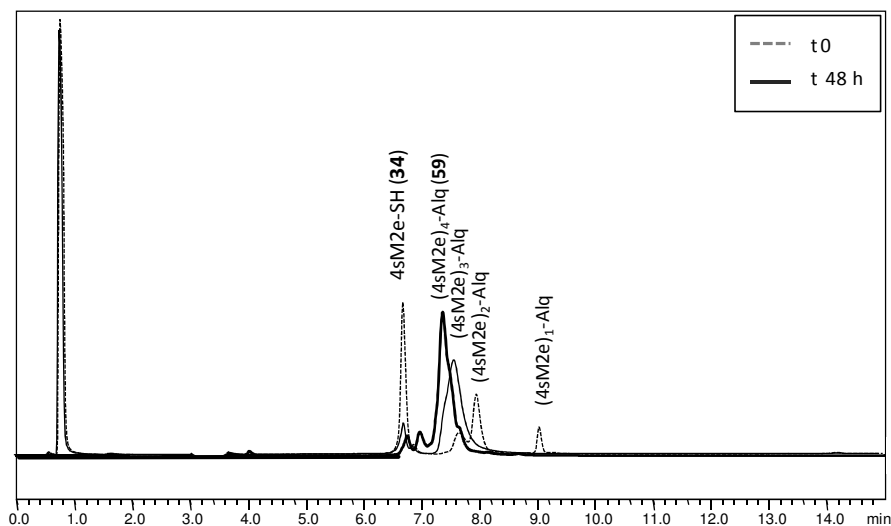


Figura 55. Seguimiento por HPLC analítico de la reacción de formación del dendropéptido intermedio 59.

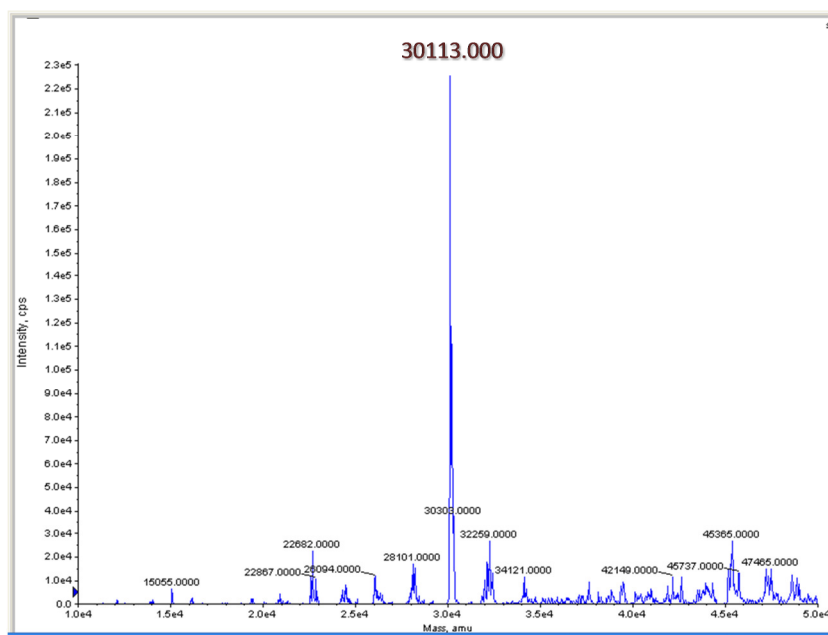


Figura 56. Espectro de masas del compuesto **59** tras purificación por RP-HPLC semipreparativo.

Además se obtuvieron de manera sencilla sistemas multivalentes de hasta 8 copias de péptidos problemáticos como M2e (Figura 57). Para este caso, se partió de 2 equivalentes del MAP **35** por maleimida del dendrón D₂-Alq (**13**) pensando que, dado el impedimento estérico, la formación del enlace tioéter transcurriría con dificultad. Sin embargo, tras una hora de reacción se había consumido todo el dendrón maleimida de partida y no se encontró el compuesto monosustituido ((4M2e)₁-Alq). Por ello, se decidió añadir más cantidad del compuesto **13** de tal forma que se consumiese totalmente el MAP de partida. El compuesto **60** se obtuvo como único producto en la reacción (Figura 57), pudiéndose utilizar en el siguiente paso sin purificación previa. Se puede decir pues, que con esta metodología convergente se superan claramente las limitaciones de la SPPS en la síntesis de sistemas de elevada multivalencia.

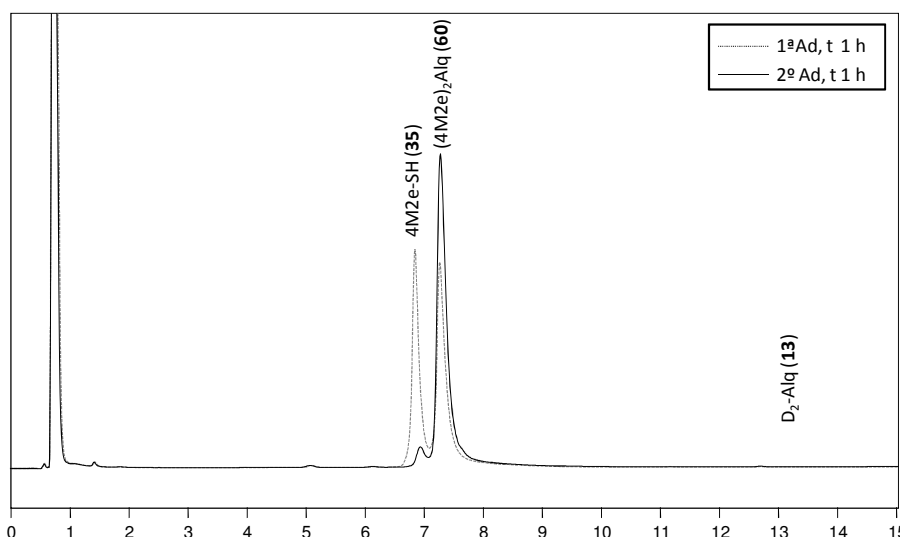


Figura 57. Formación del dendropéptido $(4M2e)_2\text{-Alq}$ (**60**). En línea discontinua se puede observar como ha desaparecido completamente el dendrón maleimida, no detectándose restos del intermedio monovalente $((4M2e)_1\text{-Alq})$. Tras adición de los correspondientes equivalentes del dendrón **13**, la reacción se completa, obteniéndose un único producto final (línea continua).

Una vez sintetizados estos dendropéptidos intermedios, se procedió a su conjugación con los glicodendrones **8** y **10** mediante cicloadición 1,3-dipolar entre azidas y alquinos. Las condiciones empleadas fueron las mismas que para el método directo: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, TBTA y ascorbato sódico, en una mezcla 2:3 (v/v) de THF/tampón fosfato (33mM, pH 7.4). Del mismo modo, las conversiones de dendropéptidos intermedios a glicodendropéptidos, fueron prácticamente cuantitativas. Utilizando esta metodología se sintetizaron los GDPs descritos en la siguiente tabla (**63-75**).

Compuesto	Nomenclatura abreviada	Péptido/Manosa	PM [mo/av] (calculado)	PM (encontrado)
63	$(sM2e)_2\text{-Man}_9$	2:9	7548.0/7552.4	7548.0
64	$(M2e)_2\text{-Man}_3$	2:3	7355.1/7359.5	7355.0
65	$(M2e)_2\text{-Man}_9$	2:9	10107.2/10113.2	10113.2
66	$(NP)_2\text{-Man}_9$	2:9	6647.4783/6651.6376	6652.1324
67	$(sM2e)_4\text{-Man}_9$	4:9	11237.5299/11244.2268	11246.2801
68	$(M2e)_4\text{-Man}_3$	4:3	13603.7/13612.1	13611.8
69	$(M2e)_4\text{-Man}_9$	4:9	16355.8156/16365.6756	16356.0658
70	$(NP)_4\text{-Man}_9$	4:9	9436.4360/9442.6228	9441.8254
71	$(4sM2e)_2\text{-Man}_9$	8:9	18931.8/18943.0	18951.0
72	$(4M2e)_2\text{-Man}_9$	8:9	29151.4/29168.9	29228.0
73	$(4NP)_2\text{-Man}_9$	8:9	15713.5/15723.7	15746.0
74	$(4sM2e)_4\text{-Man}_9$	16:9	34005.1/34025.3	34115.0
75	$(4NP)_4\text{-Man}_9$	16:9	27568.5/27586.8	27600.9

Tabla 7. GDPs finales **63-75** sintetizados mediante el método indirecto.

Es importante señalar que utilizando esta metodología se obtienen GDPs con una relación carbohidrato/péptido de 9:16, lo cual supone el mayor sistema peptídico multivalente y manosilado descrito, obtenido como una entidad monodispersa.²⁰⁵ Para el compuesto de mayor peso molecular (**74**), la caracterización por masas fue algo menos concluyente que para los otros compuestos de este estudio. No obstante, los datos de masas de los que disponemos, junto con el bien definido perfil de reacción seguido por HPLC, respaldan la estructura propuesta (Figura 58 y 59).

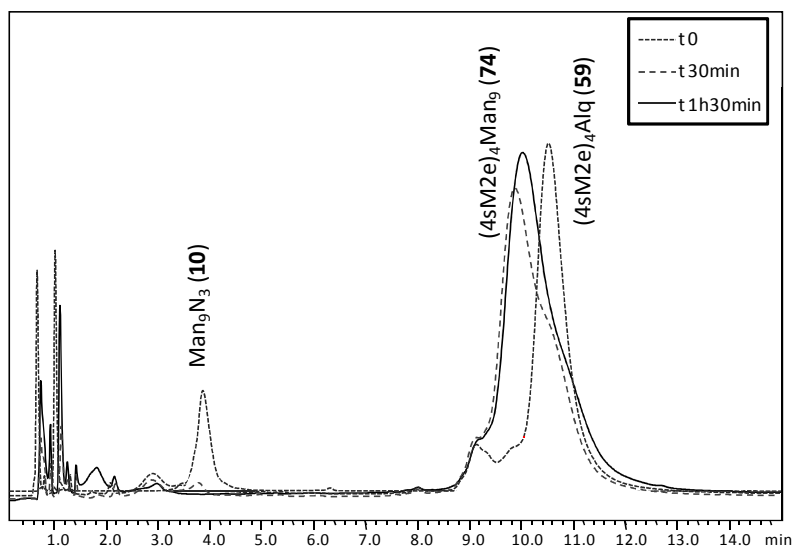


Figura 58. Seguimiento de la reacción por HPLC para la obtención del GDP **74**.

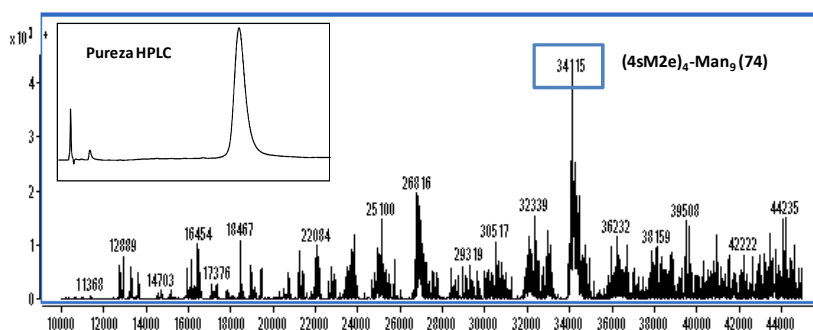


Figura 59. Espectro de masas (ESI) del GDP **74** tras purificación por HPLC.

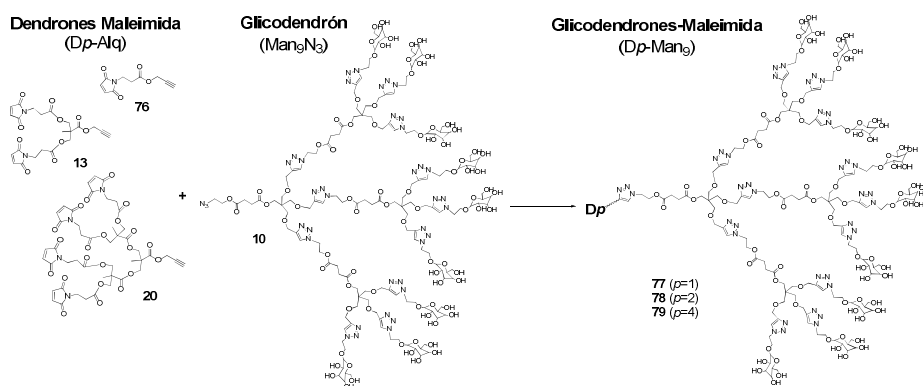
²⁰⁵ W. Kowalczyk, A. Mascaraque, M. Sánchez-Navarro, J. Rojo, D. Andreu, *Eur. J. Org. Chem.*, **2012**, 4565-4573.

Si bien es cierto que la versatilidad de este método indirecto permite la formación de una amplia variedad de sistemas de diferentes valencias y epítomos de interés biológico (tanto en la parte de carbohidrato, como en la parte peptídica), a la hora de trabajar con péptidos de doble carga tales como OT1 y OT2 nos encontramos con ciertos problemas sintéticos.

Para estos casos, al tratar de disolver los dendropéptidos intermedios **54-57** en el medio de reacción para llevar a cabo la CuAAC éstos precipitaban, no permitiendo la formación de los GDPs correspondientes. Se probaron otros disolventes sin éxito, ya que a pHs en torno a 6-7 (necesarios para que se dé la cicloadición 1,3-dipolar) tenía lugar la precipitación de dichos compuestos. Una posible explicación podría basarse en el punto isoeléctrico de dichos péptidos al pH necesario para la *click*, lo cual sumado a la multivalencia y la gran parte apolar aportada por los dendrones maleimida, daba lugar a problemas de solubilidad en las condiciones de reacción. De hecho, en el primer paso de formación de los dendropéptidos intermedios, se observó la formación de un precipitado a medida que iba avanzando la reacción. Es por ello, que se pensó en utilizar una nueva aproximación para obtener GDPs constituidos por péptidos con estas características de solubilidad.

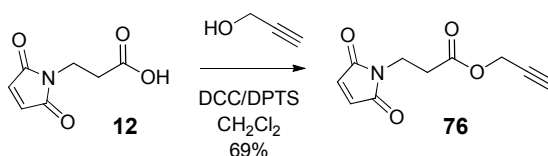
3.3.6. Síntesis de Glicodendrones-Maleimida, como Plataforma Versátil para la Obtención de GDPs. Aproximación Divergente

En esta nueva estrategia, se decidió conjugar directamente los sistemas con maleimidias a los glicodendrones de manosa mediante cicloadición 1,3-dipolar entre azidas y alquinos (Esquema 28). Como sistema de carbohidrato se eligió tan solo el glicodendrón nonavalente **10** debido a su interés biológico. Además, se pensó que podría ser útil construir un soporte que contuviese un único grupo maleimida (compuesto **77**). De esta forma, se podrían obtener los respectivos controles monovalentes de una manera directa sin necesidad de sintetizar los epítomos funcionalizados con un aminoácido Bpg terminal. Así, tan sólo la síntesis de epítomos funcionalizados con cisteína, sería suficiente para obtener un intermedio común en la construcción de sistemas de diferentes multivalencias, de un modo directo y sencillo.



Esquema 28. Representación esquemática de la síntesis de dendrones-maleimida **77-79** como intermediarios para la construcción de GPDs mediante la segunda aproximación.

Por ello, como primer paso se procedió a la síntesis del derivado monovalente de maleimida **76**, el cual poseía un grupo alquino en uno de sus extremos. La síntesis de dicho compuesto se basó también en el ácido 3-maleimido propiónico (**12**), el cual se hizo reaccionar con el alcohol propargílico en condiciones clásicas de esterificación (Esquema 29). El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía en gel de sílice, dando lugar al producto deseado con un rendimiento del 69%.



Esquema 29. Síntesis del derivado monovalente de maleimida **76**.

Para la síntesis de los glicodendrones-maleimida **77-79**, se utilizaron condiciones de *click* similares a las establecidas para los GDPs. Como fuente de cobre se empleó CuSO₄·5H₂O en presencia de TBTA y ascorbato sódico. Como disolvente, se usó una mezcla de DMSO/H₂O 1:1 (v/v). Los crudos de reacción se purificaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño, dando lugar a los correspondientes intermediarios con muy buenos rendimientos. Sin embargo, al quedar cobre quelado a los compuestos y no poder utilizar la resina Quadrasil[®]MP (QMP) por la presencia de grupos tiol (Figura 60), fue necesaria una posterior purificación mediante RP-HPLC semipreparativo, lo cual disminuyó el rendimiento hasta el 20 %. Aún así, estos intermediarios clave se obtuvieron de manera monodispersa, tal y como se pudo demostrar tanto por espectrometría de masas como por ¹H-RMN.



Figura 60. Resina Quadrasil® MP (Sigma-Aldrich). La presencia de los grupos tioles, hace imposible su uso para eliminar el cobre de los medios de reacción en la síntesis de los glicodendrones-maleimida, ya que podrían reaccionar con sus grupos funcionales.

Para todos los casos, la integración de las señales de protón en el espectro ^1H -RMN muestra una relación exacta entre los picos característicos de los dendrones maleimida y las señales del glicodendrón **10**, lo cual demuestra la formación de los correspondientes intermedios. Como ejemplo, se muestra el espectro de ^1H -RMN para el compuesto **79** (Figura 61).

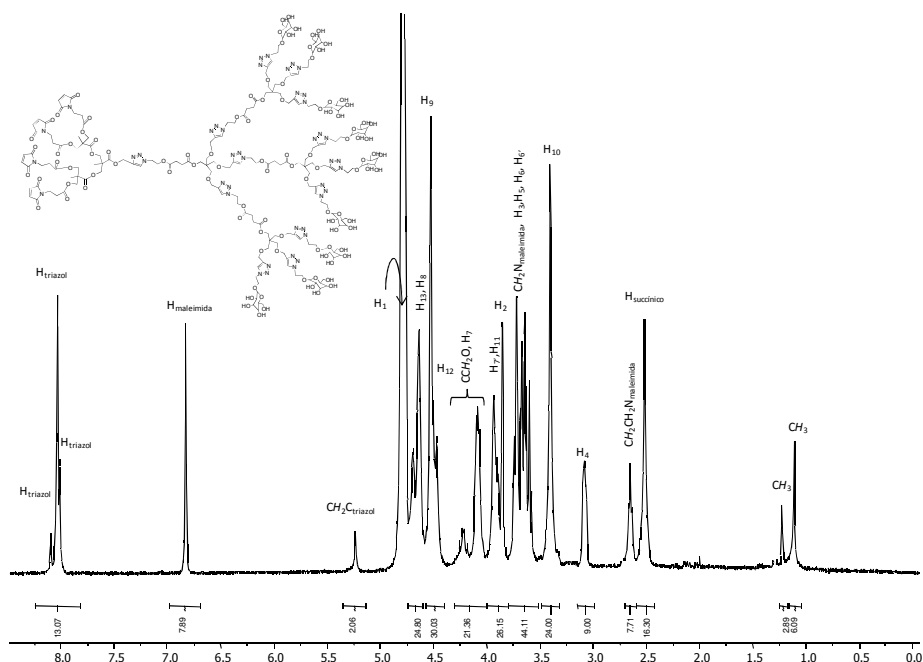
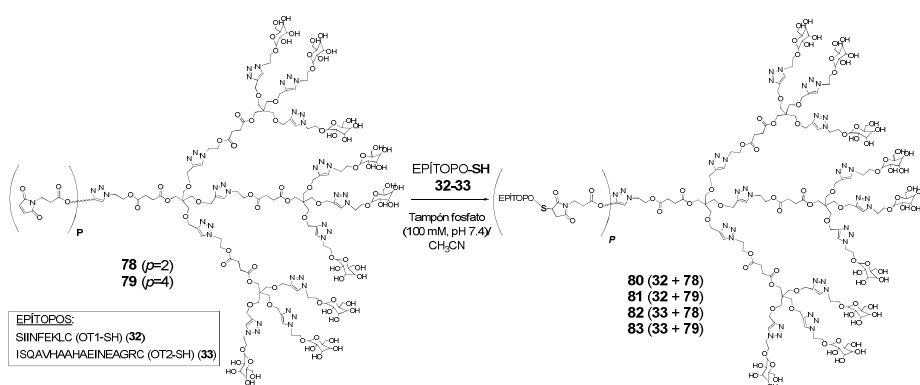


Figura 61. Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, D_2O) para el glicodendrón-maleimida **79**, en el cual se marcan las señales características de dicho compuesto.

Es necesario señalar que, aunque el glicodendrón-maleimida **77** no se ha utilizado para sintetizar ningún GDP, resulta una plataforma muy interesante para la posible construcción de controles monovalentes.

3.3.7. Síntesis de GDPs a través de Glicodendrones-Maleimida Intermedios

Mediante esta nueva aproximación se sintetizaron los GDPs di- y tetravalentes de los epítomos OT1 y OT2 (**80-83**), los cuales no pudieron ser obtenidos mediante el método indirecto de la primera aproximación. Estas reacciones se llevaron a cabo en una mezcla de tampón fosfato (100 mM, pH 7.4)/CH₃CN (1:1, v/v) a temperatura ambiente, empleándose un equivalente de péptido por unidad de maleimida de cada uno de los glicodendrones-maleimida intermedios. La completa funcionalización transcurrió en tan solo poco minutos para todos los casos, obteniéndose los correspondientes productos con porcentajes de conversión cuantitativos (Esquema 30).



Esquema 30. Síntesis de GDPs **80-83** mediante una aproximación divergente a partir de glicodendrones-maleimida intermedios.

Tras purificación mediante RP-HPLC se obtuvieron los GDPs recogidos en la siguiente tabla:

Compuesto	Nomenclatura abreviada	Péptido/Manosa	PM [mo/av] (calculado)	PM (encontrado)
80	(OT1) ₂ -Man ₉	2:9	6525.8/6529.7	6511.5
81	(OT1) ₄ -Man ₉	4:9	9193.1/9198.7	9220.9
82	(OT2) ₂ -Man ₉	2:9	8146.5/8151.2	8149.8
83	(OT2) ₄ -Man ₉	4:9	12434.5/12441.8	12443.4

Tabla 8. Glicodendripéptidos **80-83** sintetizados mediante la aproximación divergente.

Con esta nueva aproximación se pudieron sintetizar los GDPs deseados sin problemas de precipitación, lo cual se plantea como una excelente alternativa para la preparación de este tipo de sistemas. Además, de esta forma se establece un núcleo común y versátil provisto de carbohidratos, pudiéndose

funcionalizar con cualquier epítipo, ya sea peptídico o de cualquier otra naturaleza.

3.4. Evaluación biológica

Para determinar el potencial uso de estos sistemas de GDPs como vacunas, se decidieron hacer estudios de proliferación de células T para los compuestos funcionalizados con los péptidos OT1 y OT2.

Para ello se aislaron células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas de OVA del bazo y de suspensiones de células de nódulos linfáticos de ratones mutantes que expresan receptores de OT1 y OT2, respectivamente.²⁰⁶

Posteriormente, se incubaron células dendríticas de médula ósea de ratones transgénicos que expresan DC-SIGN humana con una concentración determinada de los GDPs en microplatos de 96 pocillos durante 4 horas. Tras lavado, se añadieron sobre cada pocillo bien células T CD4⁺ de ratones OT2 bien células T CD8⁺ de ratones OT1. Tras 48 horas, se añadió timidina-[3H] y 16 horas después se detectó la incorporación de la misma en el ADN de las células T en proliferación. Las células se extrajeron en filtros y la incorporación de la timidina-[3H] se midió empleando un *beta counter*, obteniendo valores de radioactividad en cpm (del inglés, *counts per minute*). Los datos obtenidos se pueden observar en la Tabla 9.

Compuesto	cpm*1000 (OT1)	cpm*1000 (OT2)
OT1 (24)	60	
(OT1) ₂ -Alq (54)	43,08	
(OT1) ₄ -Alq (55)	52,68	
OT1-Man ₉ (41)	53,91	
(OT1) ₂ -Man ₉ (80)	52,6	
(OT1) ₄ -Man ₉ (81)	52,89	
OT2 (25)		58,46
(OT2) ₂ -Alq (56)		42,66
(OT2) ₄ -Alq (57)		52,29
OT2-Man ₉ (42)		58,78
(OT2) ₂ -Man ₉ (82)		55,34
(OT2) ₄ -Man ₉ (83)		57,17

Tabla 9. Valores de radiactividad obtenidos para los GDPs de OT1 y OT2, expresados como cpg*1000, así como de los respectivos controles negativos.

²⁰⁶ J. J. García-Vallejo, M. Ambrosini, A. Overbeek, W. E. van Riel, K. Bloem, W. W. J. Unger, F. Chiodo, J. G. Bolscher, K. Nazmi, H. Kalay, Y. van Kooyk, *Mol. Immunol.*, **2013**, 53, 387-397.

Tal y como se puede observar, no se aprecian diferencias en la proliferación de células T entre los diferentes compuestos ensayados, siendo todos los valores del mismo orden, tanto para los compuestos manosilados como para los respectivos controles negativos.

Se puede decir, por tanto, que dichos sistemas no son activos para el modelo elegido, haciendo necesario replantearse si la multivalencia escogida para la parte de carbohidrato es la apropiada o bien serían necesarios glicodendrones mayores para desencadenar una respuesta inmune.

Capítulo

4

*Sistemas Dendríticos en el
Diseño de Vacunas frente a
la Hipersensibilidad
Inmediata Tipo 1 o Alergia*

4. Sistemas Dendríticos en el Diseño de Vacunas frente a la Hipersensibilidad Inmediata Tipo I o Alergia

4.1. Hipersensibilidad Inmediata Tipo I. Activación de TLRs en el Desarrollo de Vacunas contra la Alergia

Como se ha comentado anteriormente, la inmunidad innata y la adaptativa juegan un papel fundamental en la defensa del huésped frente a agentes microbianos exógenos dañinos. Sin embargo, hay ocasiones en las que el propio sistema inmunitario es el causante de enfermedades o de otras consecuencias no deseables como por ejemplo, cuando se desencadena una respuesta desproporcionada frente a un antígeno inofensivo con respecto al daño que pueda provocar el antígeno en cuestión. En estos casos se dice que se ha producido una reacción de hipersensibilidad. Se han descrito cuatro tipos de hipersensibilidad (tipos I, II, III y IV), las cuales se clasifican normalmente de acuerdo con el tipo de respuesta inmune y por el mecanismo efector responsable del daño celular y tisular. Los tres primeros tipos están mediados por *anticuerpos* (Ig) y en el cuarto, intervienen las *células T* y los *macrófagos*.²

Las *reacciones de tipo I* o *reacciones de hipersensibilidad inmediatas* se producen cuando se desencadena una respuesta mediada por la *inmunoglobulina E* (IgE) contra agentes ambientales inocuos como el polen, los ácaros del polvo doméstico o las escamas cutáneas de animales, y se conoce comúnmente como *alergia* o *atopía*.

En este tipo de reacciones, los antígenos ambientales, en este caso conocidos como *alergenos*, dirigen a la diferenciación de células CD4⁺ (T_H0) en células T_H2 y a la producción de anticuerpos (IgE) específicos que se unen a mastocitos y basófilos a través de sus receptores F_C, activándolos.¹

Las citocinas presentes en el medio son las que determinan que las células T_H0 se diferencien en T_H2 en lugar de en T_H1, desencadenando una respuesta típicamente alérgica. Así, el predominio de las citocinas IL-4 e IL-13 favorece el desarrollo de las células T_H2 y la activación de las células B para producir IgE. La producción de IL-10 por parte de las células T_H2 inhibe las respuestas de las células T_H1 a través de su efecto sobre las células presentadoras de antígeno (APC), evitando la inmunidad mediada por células y potenciando la respuesta humoral (mediada por células T_H2). Por el contrario, las respuestas

T_H1 frente a antígenos convencionales se ven favorecidas por la producción de $IFN\gamma$ e IL-12, que además impiden el desarrollo de células T_H2 . Las respuestas T_H1 promueven la producción de IgG2a y la inmunidad mediada por células T (Figura 62).²⁰⁷

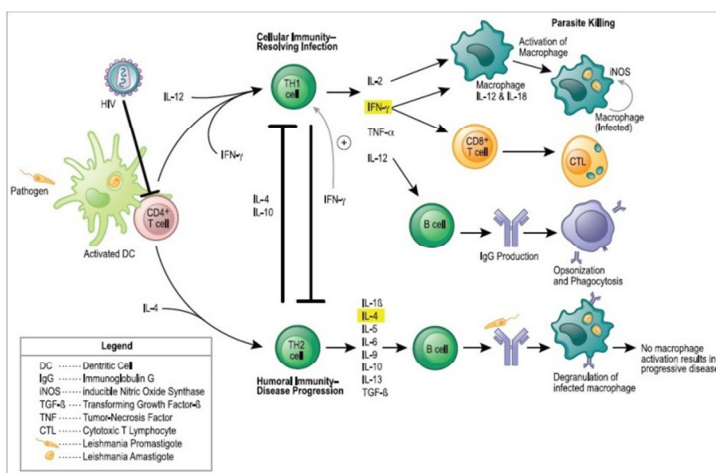


Figura 62. Diferenciación de células T_H0 o $CD4+$ naíve en función de las citocinas presentes en el medio.

Cuando se establece el contacto entre el alérgeno y las superficies mucosas, se produce una compleja serie de acontecimientos que tienen como resultado final la producción de IgE (Figura 63). La respuesta de IgE es un hecho local que se produce exclusivamente en el punto en el que el alérgeno penetra en el organismo, es decir, en las superficies mucosas y/o en los ganglios linfáticos locales. Para que las células B produzcan IgE es necesaria la presentación del antígeno por parte de las células presentadoras de antígeno (APC) a células T, así como la colaboración entre las células B y las células T_H2 . Las células T_H2 , una vez activadas por las APC, secretan unas citocinas que inducen la proliferación de las células B y promueven el inicio de una respuesta IgE. Las IgE se unen a los receptores F_C ($F_{C\epsilon}RI$) de los mastocitos, quedando éstos sensibilizados. Cuando posteriormente el alérgeno vuelve a entrar en contacto con los mastocitos sensibilizados se produce el entrecruzamiento de las IgE unidas a su superficie, lo que induce un aumento de la concentración de calcio (Ca^{2+}) intracelular provocando la *desgranulación* de dichos mastocitos. En esta desgranulación se liberan mediadores almacenados en sus gránulos. Dentro de estos mediadores encontramos tres importantes clases: las *aminas*

²⁰⁷ N. Ezra, M. T. Ochoa, N. Craft, *J. Global Infect. Dis.*, **2010**, 21, 248-257.

biogénicas, como la histamina; los *mediadores lipídicos*, como prostaglandinas, leucotrienos y PAF (factor de activación plaquetaria), y las *citocinas*, como por ejemplo TNF, IL-4, IL-13 y IL-5. Estos mediadores son los responsables de dar lugar a la sintomatología clínica típica de una alergia. Las aminas biogénicas y los mediadores lipídicos causan permeabilidad vascular, vasodilatación y broncoconstricción. A su vez, las citocinas pueden potenciar la respuesta inflamatoria y la producción de IgE por parte de los linfocitos B, responsables de la reacción de fase tardía (Figura 63).

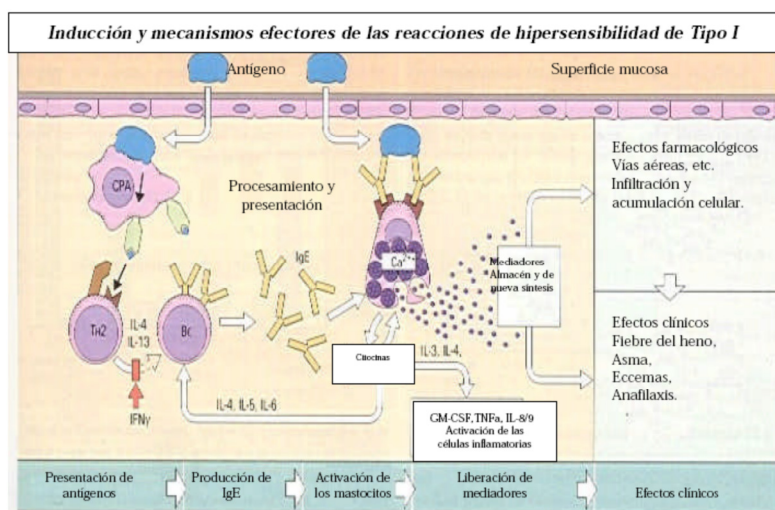


Figura 63. Inducción y mecanismos efectoros de las reacciones alérgicas.

Además de los mediadores liberados por los mastocitos, las células T_{H2} producen IL-5, que promueve la síntesis y secreción de IgA por parte de las células B y es esencial para el desarrollo y la supervivencia de los *eosinófilos* en las zonas de inflamación. Los eosinófilos son una clase especial de granulocitos que están implicados en la eliminación de parásitos y que en las reacciones alérgicas, contribuyen al daño de tejidos.

El desarrollo preferencial de respuestas T_{H2} contra antígenos ambientales inocuos en individuos atópicos (individuos alérgicos) refleja, al menos parcialmente, una alteración en los mecanismos del sistema inmune innato.¹² Alteraciones genéticas, así como factores ambientales, están envueltos en la regulación del desarrollo y función de las células T_{H2}.

El objetivo de la inmunoterapia para el desarrollo de vacunas contra estas respuestas atópicas es por tanto, reducir o modular las respuestas mediadas por T_{H2} a alérgenos específicos y la producción de IgE.

En este sentido, la activación de los receptores de tipo Toll (TLRs) se está convirtiendo en una diana terapéutica para modular las respuestas T_H2 hacia respuestas T_H1 no alérgicas. Como se ha comentado anteriormente, los TLRs tienen la habilidad de reconocer patógenos o productos derivados de patógenos e iniciar cascadas de señalización causando la activación de las defensas innatas del huésped. La activación de células dendríticas (DCs) mediada por TLRs permite a dichas células abandonar los tejidos periféricos y migrar hacia los nódulos linfáticos donde pueden activar a las células T con la secreción de citocinas como IL-12, IL-18 e $IFN\gamma$ que preferencialmente, promueven la diferenciación en células de tipo T_H1 . Por tanto, de manera global se puede decir que la activación de los TLRs generalmente induce a las células presentadoras a producir citocinas que favorecen las respuestas inmunes adaptativas del tipo T_H1 (Figura 64).

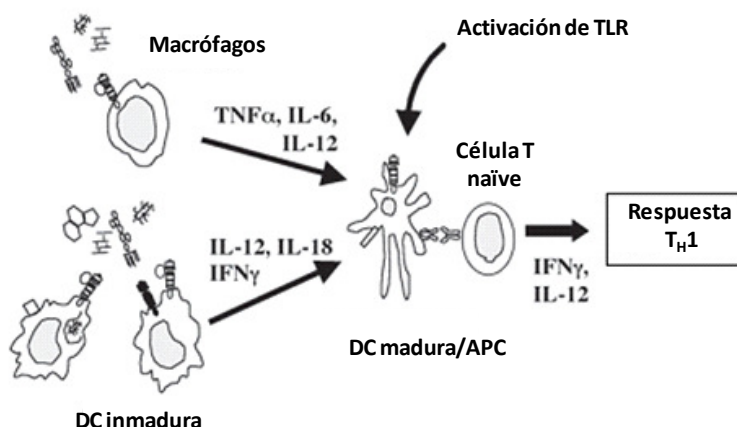


Figura 64. TLRs en la inmunidad innata y en la maduración de células dendríticas hacia una respuesta T_H1 . DC: Células Dendríticas; APC: Células presentadoras de antígenos.

Los TLRs también están expresados en células T y B. Por ejemplo, las células T $CD4+$ humanas expresan una variedad de TLRs, siendo TLR1, TLR2, TLR3, TLR5 y TLR9 las formas predominantes. Por tanto, es plausible que las pautas de señalización de los TLRs puedan jugar un papel clave en la activación de células T_H0 y su diferenciación, además de los bien conocidos efectos que ejercen sobre las DCs y los monocitos.

En concreto, el receptor TLR9^{208,209,210,211} es un receptor crítico para el reconocimiento de ADN bacteriano y ADN que presente secuencias de tipo CpG (citosina desmetilada-guanosina). Los *motivos CpG* son secuencias de oligodesoxinucleótidos (ODN) abundantes en genomas de procariontes y virus que incluyen dicha secuencia y ciertos nucleótidos de extremo. Se ha demostrado que estos motivos son inductores de las respuestas inmunes innatas a través de la interacción con el TLR9. Macrófagos, DCs y células B son los principales tipos de células que responden directamente al ADN CpG. Básicamente, el ADN bacteriano y ODNs que lleven motivos CpG pueden producir actividad inmunoestimuladora en células T humanas y de ratón y en células presentadoras de antígeno. Ambos, inducen la regulación de moléculas co-estimuladoras y al patrón de citocinas (fundamentalmente IL-12 e IFN γ) que favorecen una respuesta T_H1, con una baja secreción de citocinas T_H2.

Por tanto, una posible estrategia para combatir la sintomatología clínica propia de individuos atópicos podría basarse en intentar modificar el desarrollo preferencial de respuestas T_H2 alérgicas hacia un patrón de respuestas T_H1 no atópico. En base a todo esto, se puede decir que la combinación directa de ligandos estimuladores de receptores TLR y un alérgeno determinado, podría ser un método efectivo para inducir la protección profiláctica y terapéutica contra desórdenes atópicos, dando lugar a una interesante aplicación en el campo de las vacunas.^{212,213,214}

Por otro lado, es ampliamente conocido el efecto de la multivalencia en las interacciones entre los diversos elementos del sistema inmune. Por ejemplo, los anticuerpos tienen múltiples receptores equivalentes: dos (IgD, IgE, IgG, IgA), cuatro (IgA), seis (IgA), diez (IgM).²² La unión polivalente a aquellas estructuras que reconocen (antígenos u otros ligandos en la superficie de virus y bacterias) parece ser una característica omnipresente en el reconocimiento

²⁰⁸ F. Takeshita, C. A. Leifer, I. Gursel, K. J. Ishii, S. Takeshita, M. Gursel, D. M. Klinman, *J. Immunol.*, **2001**, 167, 3555-3558.

²⁰⁹ A. Heit, T. Maurer, H. Hochrein, S. Bauer, K. M. Huster, D. H. Busch, H. Wagner, *J. Immunol.*, **2003**, 170, 2802-2805.

²¹⁰ S. Cornélie, J. Hoebeke, A.-M. Schacht, B. Bertin, J. Vicogne, M. Capron, G. Riveau, *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 15124-15129.

²¹¹ C. C. N. Wu, J. Lee, E. Raz, M. Corr, D. A. Carson, *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 33071-33078.

²¹² A. M. Krieg, *Nat Rev Drug Discov*, **2006**, 5, 471-484.

²¹³ H. Tighe, K. Takabayashi, D. Schwartz, G. Van Nest, S. Tuck, J. J. Eiden, A. Kagey-Sobotka, P. S. Creticos, L. M. Lichtenstein, H. L. Spiegelberg, E. Raz, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **2000**, 106, 124-134.

²¹⁴ P. Parronchi, F. Brugnolo, F. Annunziato, C. Manuelli, S. Sampognaro, C. Mavilia, S. Romagnani, E. Maggi, *J. Immunol.*, **1999**, 163, 5946-5953.

inmune. Estas interacciones pueden tanto inhibir procesos de infección como promover la eliminación de las partículas extrañas mediante degradación por macrófagos u otros componentes del sistema inmune o por filtración renal. En este caso, la polivalencia sirve para aumentar la afinidad de unión a superficies que tienen epítopos repetidos, una característica común en casi todos los patógenos invasores.

Otro ejemplo de interacción polivalente es el de mastocitos activados por IgE. Estos mastocitos presentan múltiples copias de los anticuerpos IgE (bivalentes) en su superficie y pueden desgranularse, dando lugar a la liberación de histamina y en consecuencia, a una sintomatología alérgica en respuesta a un amplio rango de alérgenos (ligandos de IgE). Ligandos monovalentes de IgE no desencadenan desgranulación. Sin embargo, la unión polivalente de epítopos de un alérgeno determinado puede dirigir el entrecruzamiento de dos moléculas de IgE, lo cual inicia una cascada de señalización que finaliza con la desgranulación y la consecuente liberación de histaminas (Figura 65). La unidad mínima de IgE que debe haber sobre la superficie de un mastocito necesaria para la liberación de histamina es dos y por tanto, la desgranulación requiere que el antígeno tenga $N \geq 2$ unidades.

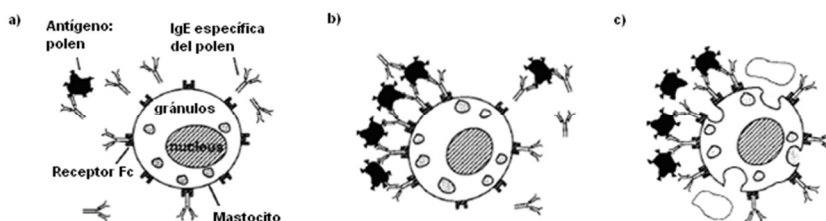


Figura 65. Desgranulación de mastocitos tras la interacción de un alérgeno polivalente. a) Tras la primera exposición del polen, la interleucina 4 (IL-4) hace que las células B produzcan IgE en respuesta a los antígenos del polen. b) La siguiente exposición al polen desencadena la activación de los mastocitos por interacción multivalente y entrecruzamiento de las moléculas de IgE y los antígenos. c) Un mastocito activado libera su contenido por exocitosis de gránulos como la histamina y la heparina, causando rinitis alérgica (fiebre del heno).

Por tanto, la desgranulación de mastocitos ilustra un importante ejemplo de las interacciones polivalentes en la membrana celular. Todos estos hechos resultan interesantes a la hora de diseñar una posible vacuna contra un determinado alérgeno. En los últimos años ha habido un enorme interés por las aplicaciones de nanoestructuras dendriméricas funcionalizadas en diferentes áreas biomédicas con un potencial uso como vacunas, la mayoría basadas en la conjugación de péptidos.¹⁵⁶ En concreto, la combinación de

estructuras multivalentes de alergenios peptídicos con elementos inmunoestimuladores de respuestas T_H1 como oligonucleótidos CpG, podría modular la respuesta inmune de individuos alérgicos, dando lugar a interesantes aplicaciones en el campo de la vacunación.

En concreto, los alergenios del polen se encuentran entre los inductores naturales más frecuentes de la sintomatología alérgica. Entre ellos los alergenios del polen del olivo (*Olea europaea*) son los responsables de desencadenar la hipersensibilidad inmediata de tipo I en un elevado porcentaje de población en la zona del Mediterráneo. Se han aislado diversos alergenios del polen del olivo, sin embargo, la glicoproteína *Ole e 1* es la más común y tiene una frecuencia de unión a IgE de aproximadamente el 80% en pacientes que se ven afectados por dicho polen. Además, se ha demostrado que el epítipo *Ole e 1*₁₀₉₋₁₃₀ es capaz de estimular células T de pacientes alérgicos.²¹⁵ Esta región constituye el epítipo más importante del *Ole e 1* en humanos y el dominante en ratones, por lo que se ha escogido como péptido de estudio para corroborar nuestra hipótesis.

4.2. Objetivos

Teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente, se pretende diseñar una estructura modular funcionalizada que integre los componentes necesarios para modificar una respuesta inmunológica desde un patrón de respuestas T_H2 (alérgica) hacia uno T_H1 . Básicamente, la estructura consistiría en un dendrón que permitiese la presentación multivalente de un epítipo dominante de células T y un estimulador sintético del receptor TLR9 que desencadene respuestas inmunes mediadas por linfocitos T de tipo T_H1 .

En concreto, se propone la conjugación directa de ADN CpG (secuencia inmunoestimuladora del receptor TLR9) a un alergenio determinado, en este caso el *Ole e 1*₁₀₉₋₁₃₀ (epítipo del polen del olivo, de ahora en adelante se nombrará sólo como *Ole*₁₀₉₋₁₃₀), como un método efectivo para inducir la protección profiláctica y terapéutica contra desórdenes atópicos, en este caso, la alergia al polen del olivo (*Olea europea*).

Se pretende evaluar el efecto de la multivalencia en el caso del péptido *Ole*₁₀₉₋₁₃₀, así como comprobar si su unión covalente al ADN CpG produce una mayor respuesta por el hecho de ser una única entidad (en el supuesto caso de

²¹⁵ B. Cárdbaba, V. Del Pozo, A. Jurado, S. Gallardo, I. Cortegano, I. Arrieta, Del Amo, P. Tramón, F. Florido, J. Sastre, P. Palomino, C. Lahoz, *Clin. Exp. Allergy*, **1998**, 28, 413-422.

que module la respuesta del sistema inmune hacia respuestas T_H1) que la administración combinada de péptido y ADN CpG sin conjugar.

Para conseguir este objetivo general, se proponen una serie de objetivos específicos:

- ✓ Conjugación del péptido inmunogénico al dendrón de maleimidado **20** con un grupo alquino en la posición focal, comentado en el capítulo 3.
- ✓ Conjugación del ADN CpG provisto de un espaciador con un grupo amino terminal, disponible comercialmente, a otro espaciador que contenga un grupo azida para su posterior anclado al sistema comentado en el objetivo anterior.
- ✓ Unión covalente del dendrímero peptídico y el ADN CpG apropiadamente funcionalizado.
- ✓ Evaluación biológica: Se llevarán a cabo los ensayos biológicos oportunos que determinen la efectividad de nuestro sistema para inducir respuestas T_H1 , utilizando soportes mono y multivalentes provistos tanto del péptido, por un lado, y del ADN CpG por otro, conjugados y sin conjugar, para demostrar el efecto que la unión de estas dos biomoléculas provoca en ratones anafilácticos.

4.3. Síntesis de Dendropéptidos Funcionalizados con una Secuencia de ADN CpG Inmunoestimuladora para el Desarrollo de Vacunas Sintéticas frente a Hipersensibilidad Inmediata de Tipo I

4.3.1. Síntesis de Dendropéptidos de Ole e $1_{109-130}$

Como primera aproximación para la síntesis de los sistemas híbridos diseñados para el desarrollo de vacunas sintéticas frente a la alergia del polen, se decidió emplear los dendrones de maleimida **13** y **20** como soporte para la conjugación del péptido inmunogénico Ole e $1_{109-130}$. Estos dendrones, provistos de un grupo alquino en su posición focal, han demostrado ser unas plataformas ideales para la construcción de sistemas multivalentes de péptidos *via* adición de Michael del grupo tiol de una cisteína terminal de la secuencia peptídica, al grupo maleimida, tal y como se ha descrito en el capítulo 3.

Para optimizar la síntesis, se comenzó por la construcción del sistema divalente a partir de la reacción del dendrón de maleimida **13** y la secuencia KPLAEKKFFGLPNVTRTTGNVT provista de una cisteína terminal, preparada en el laboratorio del Profesor David Andreu. Siguiendo la metodología descrita en el método indirecto de la aproximación convergente de la síntesis de glicodendropéptidos (Capítulo 3), se sintetizó el dendropéptido **84**, con tiempos de reacción cortos y porcentajes de conversión prácticamente cuantitativos (Figura 66).

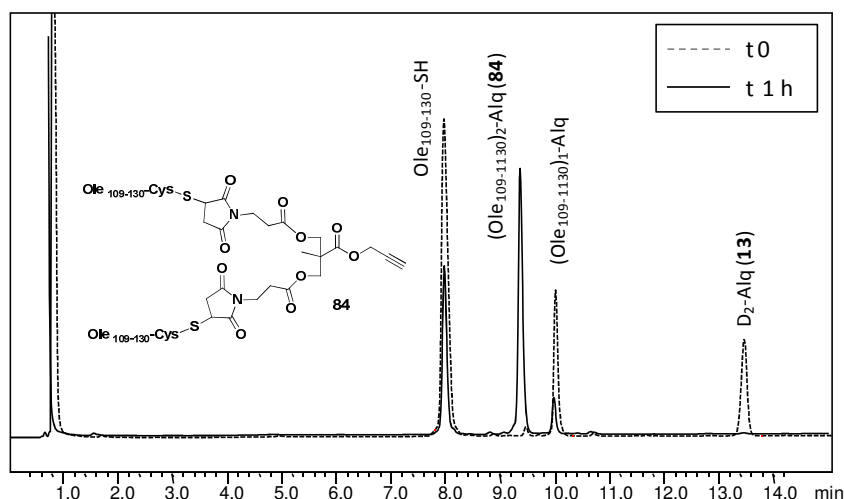


Figura 66. Seguimiento de la reacción de conjugación del dendrón divalente **13** y el péptido Ole₁₀₉₋₁₃₀ provisto con una Cys terminal. A $t = 0$ (línea discontinua), se observa sólo el correspondiente derivado monovalente. Transcurrida 1h de reacción (línea continua), la conjugación se ha completado.

Una vez comprobada la eficacia de la conjugación de este nuevo péptido al sistema de dos maleimidas, se procedió a la conjugación del mismo al derivado tetravalente **20**. Según lo esperado, la reacción fue prácticamente cuantitativa dando lugar, tras purificación mediante RP-HPLC, al correspondiente dendropéptido **85** con cuatro copias del alérgeno y un grupo alquino en su posición focal (Figura 67).

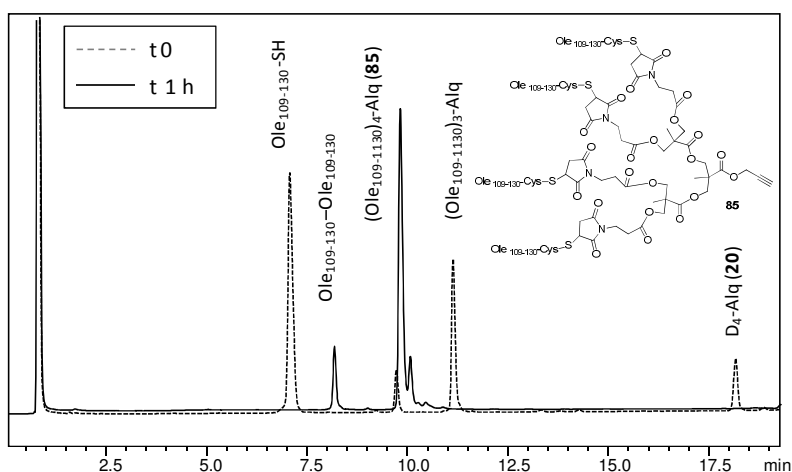


Figura 67. Seguimiento de la reacción por RP-HPLC entre el dendrón tetravalente de maleimida **20** y el péptido Ole₁₀₉₋₁₃₀.

4.3.2. Síntesis de Secuencias de ADN Adecuadamente Funcionalizadas

La secuencia de ADN CpG se encuentra disponible comercialmente funcionalizada con un grupo amino en el grupo fosfato de su extremo 5' (Figura 68).

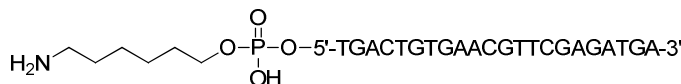


Figura 68. Estructura del ADN CpG-NH₂ disponible comercialmente que se empleará para las conjugaciones.

Además, en las casas comerciales se puede encontrar también un mimético de ADN más estable a la degradación frente a nucleasas (PTO, de *Phosphothioate Oligonucleotide*), que reemplaza un átomo de oxígeno del grupo fosfato de unión entre los nucleótidos, por un átomo de azufre (Figura 69). Este ODN es también fácilmente funcionalizable mediante un espaciador con un grupo amino en su extremo 5' (PTO CpG-NH₂).

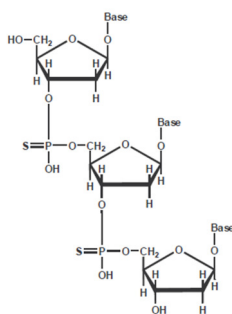


Figura 69. Oligonucleótido PTO.

Sin embargo, para poder conjugar estas secuencias de ADN a los correspondientes dendropéptidos mediante cicloadición 1,3-dipolar (CuAAC), es necesario funcionalizar dichas secuencias de oligodesoxinucleótidos con un grupo azida en uno de sus extremos. Por ello, se decidió hacer reaccionar los correspondientes derivados comerciales comentados anteriormente con un espaciador basado en etilenglicol (N3-dPEG(4)-NHS). Este espaciador estaba provisto por un lado, de un ácido carboxílico activado mediante *N*-hidroxisuccinimida (NHS) y por otro, de un grupo azida (Figura 70).

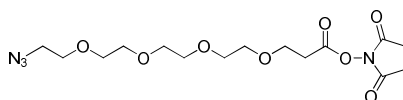


Figura 70. Espaciador escogido para la apropiada funcionalización de la secuencia de ADN (N3-dPEG(4)-NHS).

Este espaciador, disponible comercialmente, permitiría la conjugación por un lado de la secuencia de ADN *via* formación de enlace amida y por otro, del dendropéptido *via* CuAAC (Figura 71).

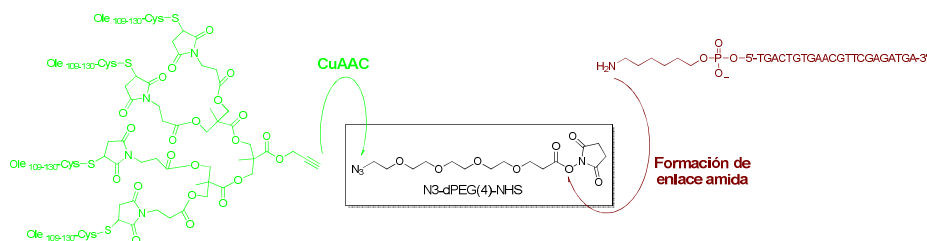


Figura 71. Estrategia a seguir para la conjugación del dendropéptido **85** y una secuencia de ADN CpG.

Así, la reacción del espaciador con ambas secuencias (ADN CpG y su correspondiente PTO) en tampón $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ (0.5M, pH 8.8) y DMSO (3:1, v/v)²¹⁶ dio lugar a los correspondientes derivados de oligonucleótido con un grupo azida en sus extremos 5' con porcentajes de conversión prácticamente cuantitativos y de manera casi instantánea (ejemplo de la reacción entre el ADN-NH₂ y el espaciador comercial en la Figura 72).

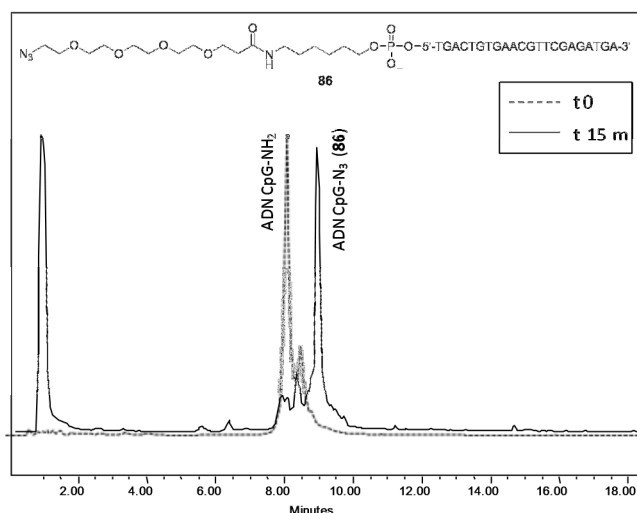


Figura 72. Seguimiento de la reacción mediante RP-HPLC entre el espaciador comercial y el ADN CpG-NH₂, para dar lugar al correspondiente derivado azida **86**.

Tras purificación mediante NAP-5 se obtuvieron los correspondientes derivados azida **86** (ADN CpG-N₃) y **87** (PTO CpG-N₃) con rendimientos del 73 y el 61%, respectivamente, calculados mediante espectroscopía de UV-vis por absorbancia a 260 nm. La formación de estos ODN se demostró por espectrometría de masas MALDI-TOF (Figura 73).

²¹⁶ R. Kumar, A. El-Sagheer, J. Tumpane, P. Lincoln, L. M. Wilhelmsson, T. Brown, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 6859-6864.

Efectivamente, al llevar el dendrón peptídico a medios de pHs en los que tiene lugar la reacción de *click* (pH 6-7), éste precipitaba. Lo mismo sucedía para el dendrón tetravalente. Por tanto, esta no parece ser la mejor estrategia para obtener dichos conjugados de ADN.

Una posible solución a estos problemas podría ser el emplear la estrategia divergente utilizada para el caso de la síntesis de los glicodendropéptidos (Capítulo 3). De esta manera se podría llegar a una plataforma versátil que permitiese la funcionalización con otro tipo de péptido o de biomolécula de interés terapéutico (Figura 74). Actualmente, en nuestro laboratorio se está trabajando en poner a punto esta nueva estrategia para la preparación de conjugados alérgeno-ADN-CpG.

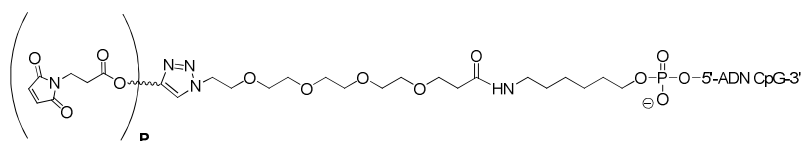


Figura 74. Posible solución para la síntesis de conjugados ADN-péptido. ($p = 1,2,4$).

4.4. Evaluación Biológica

A pesar de no haber llegado a la estructura bifuncionalizada objetivo, se decidió estudiar el efecto de la inmunoterapia específica empleando el sistema dendrítico de cuatro copias de péptido ((Ole₁₀₉₋₁₃₀)₄-Alq **85**). Asimismo, se pensó evaluar si la presencia del inmunomodulador CpG era capaz de modificar el patrón de respuesta desde T_H2 a T_H1. Para ello, se empleó un modelo anafiláctico en ratón.

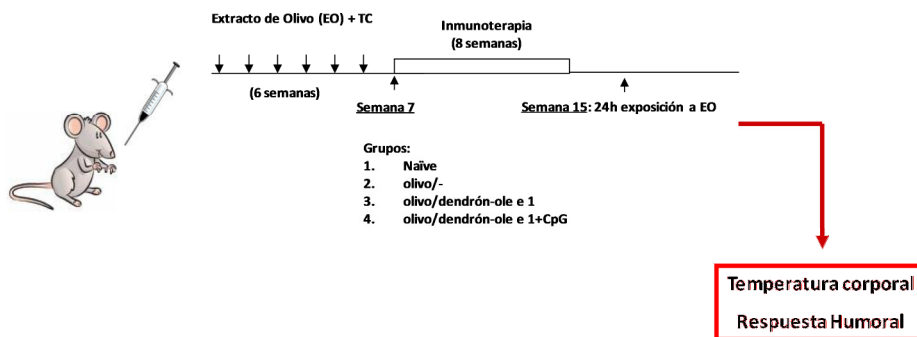


Figura 75. Ensayos biológicos empleando ratones C57B1/c.

En estos ensayos fueron necesarios cuatro grupos de ratones. El primer grupo (*naïve*), consistía en ratones sin tratar o no anafilácticos que servirían como control tanto en el estudio *in vivo* (medida de la temperatura corporal) como en el estudio *in vitro* del patrón de inmunoglobulinas. Los otros tres grupos requerían ratones anafilácticos, para lo cual éstos fueron previamente sensibilizados por vía intranasal con 10 µg del extracto de olivo y 1 µg de la toxina del cólera durante 6 semanas (Figura 75).

A la séptima semana, el segundo grupo de ratones (olivo/-) se mantuvo sin inmunoterapia específica, mientras que el tercer y cuarto grupo se trataron subcutáneamente con la estructura dendrímica ((Ole₁₀₉₋₁₃₀)₄-Alq ò **85**) en ausencia o presencia del inmunomodulador PTO-CpG, respectivamente (Figura 75). Para comprobar el efecto inmunomodulador de la terapia, tras 8 semanas de tratamiento, los ratones se provocaron con 100 µg del extracto de olivo mediante inyección intraperitoneal. En este punto, se midió la aparición de síntomas de anafilaxia a través del descenso de la temperatura corporal utilizando un termómetro digital rectal. Posteriormente, los ratones fueron sacrificados y se midió la respuesta humoral en muestras de sangre empleando ELISA.

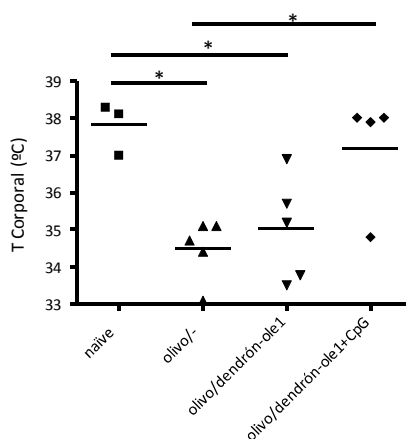


Figura 76. Temperatura corporal de los cuatro grupos de ratones tras tratamiento con el extracto de olivo.

Los ratones sensibilizados mostraron una disminución significativa en la temperatura corporal tras ser expuestos al extracto de olivo en comparación con los ratones *naïve* (Figura 76). Los ratones tratados con la estructura dendrímica (olivo/dendrón *Ole1*) también manifestaron dicha disminución dentro de niveles similares, lo cual indica que el péptido unido al dendrón de maleimidado es reconocido *in vivo* por el sistema inmune. Por el contrario, y

según lo esperado, los ratones tratados con el compuesto **85** en presencia de PTO-CpG (olivo/dendrón *Ole1* + CpG), no mostraron disminución de la temperatura corporal, presentando niveles similares a los ratones no tratados y significativamente mayores en comparación con el grupo anafiláctico, indicando que dichos ratones estaban protegidos de la aparición de la anafilaxia sistémica tras la exposición con el alérgeno.

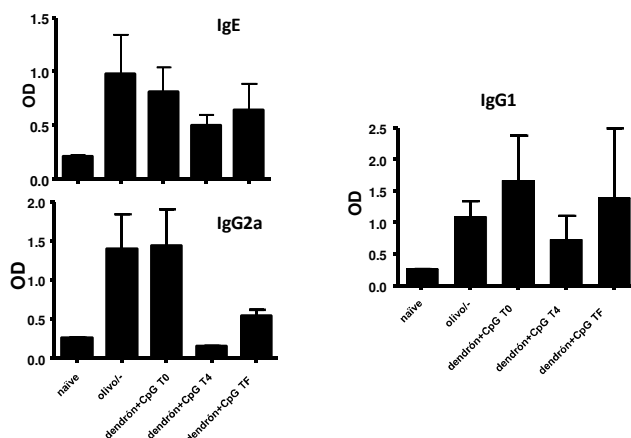


Figura 77. Niveles de IgE, IgG1 e IgG2a para ratones no anafilácticos (*naïve*), anafilácticos (olivo) y tratados con el dendrón de Ole₁₀₉₋₁₃₀ en presencia de CpG a tiempo 0 (T0), 4 semanas (T4) y 8 semanas (T8).

Con respecto a los estudios *in vitro*, se midieron los niveles de la IgE específica de olivo mediante ELISA. Los resultados mostraron un aumento de la IgE específica a Ole e 1 en ratones con anafilaxia sistémica. Cuando se comparan los niveles a lo largo del tiempo del tratamiento con la estructura dendrímica y CpG, se pudo comprobar un ligero descenso, especialmente a mitad del tratamiento (Figura 77, IgE, T4).

Los niveles de la IgG1 específica, inmunoglobulina típica de un perfil T_H2, mostraron un aumento en ratones sensibilizados. Al igual que para IgE, los niveles de este anticuerpo decrecieron significativamente a mitad del tratamiento (Figura 77, IgG1, T4).

Finalmente, en contra de lo esperado, los niveles de IgG2a (inmunoglobulina característica de un patrón T_H1) también se redujeron drásticamente a mitad del tratamiento, manteniéndose bajos al final del mismo (Figura 77, IgG2a). Este dato, en principio inexplicable, hace necesaria la repetición del estudio para corroborar los resultados obtenidos.

Aún así, se puede concluir que la estructura dendrimérica diseñada ((Ole₁₀₉₋₁₃₀)₄-Alq ò **85**) es reconocida por el sistema inmune *in vivo*. Además los ratones sensibilizados con el extracto de olivo y tratados con (Ole₁₀₉₋₁₃₀)₄-Alq + CpG, mostraron una disminución significativa de los síntomas anafilácticos, encontrándose una reducción en la respuesta humoral, especialmente a la cuarta semana de tratamiento (T4).

Estos resultados sugieren que la inmunoterapia con estructuras dendriméricas de alergenios en presencia de un factor inmunomodulador es capaz de proteger a ratones sensibilizados de la aparición de la anafilaxia.



Capítulo

5

*Conjugados PNA-
Glicodendrón para el
Desarrollo de Agentes
Antisentido*

5. Conjugados PNA-Glicodendrón para el Desarrollo de Agentes Antisentido

5.1. Peptide Nucleic Acids (PNAs): Introducción y Perspectivas

5.1.1. Uso de Oligonucleótidos como Agentes Terapéuticos

Los oligonucleótidos naturales como ADN o ARN, han demostrado a lo largo de los años un amplio repertorio de actividades interesantes frente a diversos agentes virales, oncogénesis, productos de genes del huésped y genes transfectados. Por tanto, existe una clara evidencia que apoya la potencial y extensa aplicación de estos compuestos como agentes terapéuticos.²¹⁷

Los ácidos nucleicos, especialmente los ADNs de doble hebra, se unen a un gran número de ligandos de origen natural o de naturaleza sintética, como antibióticos o agentes antitumorales,^{218,219} por lo que el reconocimiento de secuencias de ácidos nucleicos específicas ha sido objeto de numerosos estudios dentro del campo de la química médica. Sin embargo, de todos estos ligandos, los únicos que consiguen alcanzar un elevado grado de especificidad son los propios ácidos nucleicos, cuyo reconocimiento está mediado por la regla de los pares de bases de Watson y Crick (Figura 78).²²⁰

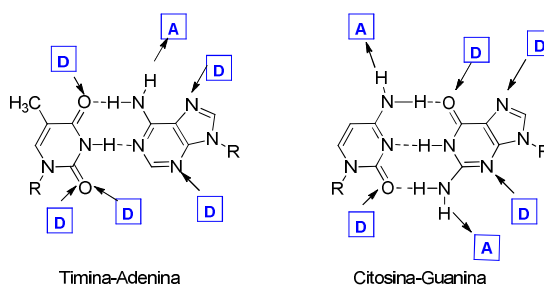


Figura 78. Formación de pares de bases Watson-Crick. En la figura se indican los sitios de donador de enlace de hidrógeno (D) y aceptor (A) entre el surco menor y el surco mayor.

Gracias a este reconocimiento tan selectivo y conociendo las reglas que lo gobiernan, es posible diseñar oligonucleótidos que reconozcan cualquier

²¹⁷ P. D. Cook, *Anticancer Drug Des.*, **1991**, 6, 585-607.

²¹⁸ D. C. Baguley, *Anticancer Drug Des.*, **1991**, 6, 1-35. *Anticancer Drug Des.*, **1991**, 1-35

²¹⁹ C. Bailly, J. P. Henichart, *Bioconjugate Chem.*, **1991**, 2, 379-393.

²²⁰ J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature*, **1953**, 171, 737-738.

secuencia objetivo, lo cual tiene numerosas aplicaciones en el diseño de agentes terapéuticos basándose en el control génico y en la inhibición de los procesos de transcripción, traducción o replicación del ADN.²²¹

Sin embargo, aunque los oligonucleótidos naturales han demostrado tener propiedades terapéuticas *in vitro*, tanto el ADN como el ARN se degradan rápidamente *in vivo* por efecto de las nucleasas. Es por ello que durante las últimas dos décadas se han sintetizado numerosos análogos de oligonucleótidos con el fin de solucionar esta falta de estabilidad. Alguno de estos análogos se encuentran representados en la figura 79.^{222,223,224,225,226}

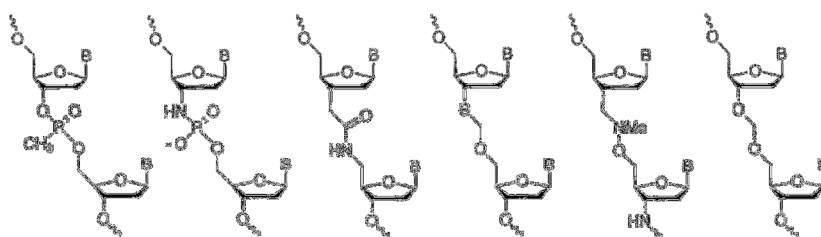


Figura 79. Ejemplos de oligonucleótidos modificados.

Entre estos análogos, se encuentran los ácidos nucleicos peptídicos o PNAs (del inglés, *Peptide Nucleic Acids*), descritos por primera vez en 1991 por el grupo de Nielsen (Figura 80).²²⁷ Los PNAs son unos miméticos del ADN en los cuales el esqueleto de fosfato desoxirribosa se ha sustituido por uno pseudopeptídico en el que se repiten unidades de *N*-(2-aminoetil)glicina con las bases nitrogenadas naturales unidas mediante espaciadores de metilencarbonilo (Figura 80). Al poseer esta naturaleza peptídica, los PNAs se nombran desde el extremo *N*-terminal al *C*-terminal, lo que se correspondería con la dirección 5'→3' de la secuencia de ADN equivalente.

²²¹ N. T. Thuong, C. Hélène, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1993**, 32, 666-690.

²²² P. O. P. M. Ts'o, P. S.; Aurelian, L.; Murakami, A.; Agris, C.; Blake, K. R.; Lin, S.-B.; Lee, B. L.; Smith, C.C., *Ann. N. Y Acad. Sci.*, **1988**, 507, 220-241.

²²³ S. Gryaznov, J.-K. Chen, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 3143-3144.

²²⁴ A. De Mesmaeker, A. Waldner, J. Lebreton, P. Hoffmann, V. Fritsch, R. M. Wolf, S. M. Freier, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1994**, 33, 226-229.

²²⁵ R. J. Jones, K. Y. Lin, J. F. Milligan, S. Wadwani, M. D. Matteucci, *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 2983-2991.

²²⁶ J. J. Vasseur, F. Debart, Y. S. Sanghvi, P. D. Cook, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 4006-4007.

²²⁷ P. Nielsen, M. Egholm, R. Berg, O. Buchardt, *Science*, **1991**, 254, 1497-1500.

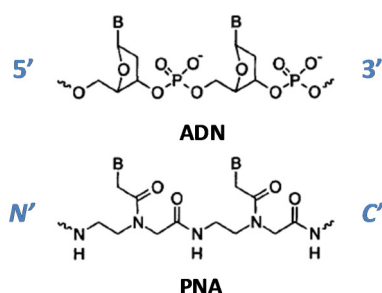


Figura 80. Comparación estructural entre el ADN y un PNA (B = base nitrogenada).

El uso de PNAs tiene ciertas ventajas con respecto al uso de oligonucleótidos naturales. Por ejemplo, el hecho de que sea un mimético neutro evita la repulsión electrostática entre él mismo y la cadena complementaria cargada negativamente de ADN o ARN, aumentando así la afinidad. Además, la construcción de estos oligómeros por acoplamiento de los aminoácidos modificados, puede tener lugar en fase sólida utilizando protocolos típicos de la síntesis de péptidos. De esta manera, los PNAs pueden obtenerse fácilmente en escala de miligramos. Esta síntesis controlada permite a su vez la funcionalización de alguno de sus extremos (C- o N-terminal) para su posterior conjugación a moléculas de interés. Otra característica importante de este tipo de compuestos es su elevada bioestabilidad, no degradándose en presencia ni de proteasas ni de nucleasas.²²⁸ Por último, los PNAs son moléculas aquirales, con lo cual se evitan los potenciales problemas de pureza enantiomérica asociados a su síntesis.

5.1.2. Síntesis de PNAs

Tal y como se ha dicho anteriormente, la síntesis de PNAs se basa en protocolos estándar en fase sólida. Al igual que en la síntesis de péptidos, se han empleado de forma general dos esquemas diferentes de protección (Fmoc²²⁹ y Boc¹⁶²), dando lugar ambas estrategias a oligómeros con elevados rendimientos y pureza.

En la primera estrategia descrita se eligió el *tert*-butoxicarbonilo (Boc) como grupo protector de la amina primaria del esqueleto pseudopeptídico. Los grupos protectores lábiles en medios ácidos resultaron ser más apropiados

²²⁸ V. V. Demidov, V. N. Potaman, M. D. Frank-Kamenetskii, M. Egholm, O. Buchardt, S. H. Sönnichsen, P. E. Nielsen, *Biochem. Pharmacol.*, **1994**, 48, 1310-1313.

²²⁹ S. A. Thomson, J. A. Josey, R. Cadilla, M. D. Gaul, C. Fred Hassman, M. J. Luzzio, A. J. Pipe, K. L. Reed, D. J. Ricca, R. W. Wiethe, S. A. Noble, *Tetrahedron*, **1995**, 51, 6179-6194.

para la síntesis de este tipo de compuestos dado que en medios alcalinos, se inducía la transferencia de la base nitrogenada *N*-terminal al grupo amino primario del esqueleto (Figura 81).

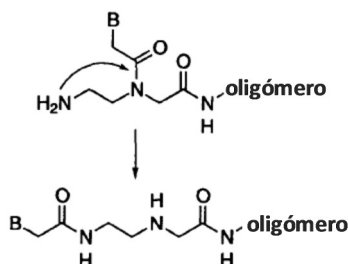
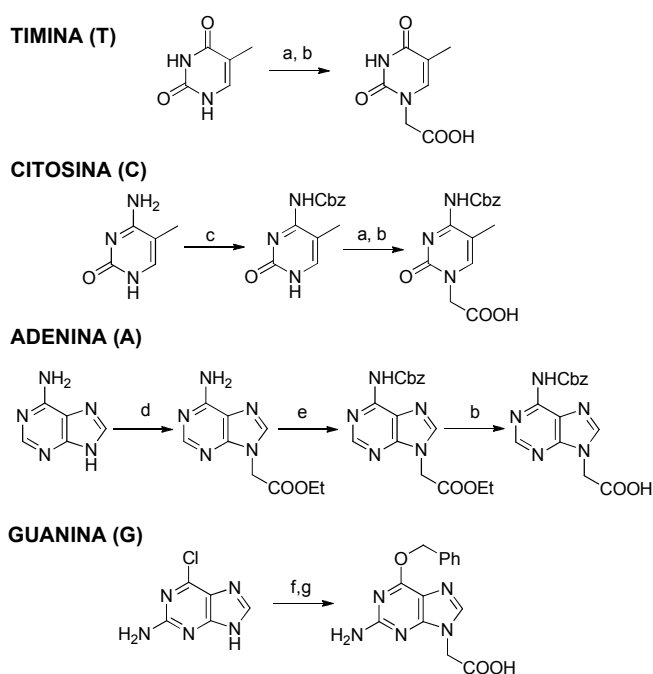


Figura 81. Reacción de transferencia de *N*-acilo que puede tener lugar bajo condiciones neutras o básicas.

Basándose en esta estrategia Boc, el grupo de Nielsen²³⁰ desarrolló una metodología para la obtención de los cuatro monómeros constituyentes de las secuencias de PNA. El monómero de *timina* (T) había sido anteriormente descrito por Nielsen.²³¹ La base nitrogenada constituyente de este monómero fue la primera en ser sintetizada, dado que al no tener un grupo amino exocíclico no requiere una etapa de protección y se puede alquilar fácilmente con bromoacetato de metilo. La posterior hidrólisis del éster metílico resultante da lugar al derivado timínico deseado de una manera directa y sencilla (Esquema 31). Es por ello, que el primer PNA descrito por Nielsen era una secuencia homotimínica.

²³⁰ K. L. Dueholm, M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, H. F. Hansen, T. Vulpius, K. H. Petersen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardt, *J. Org. Chem.*, **1994**, 59, 5767-5773.

²³¹ M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 1895-1897.

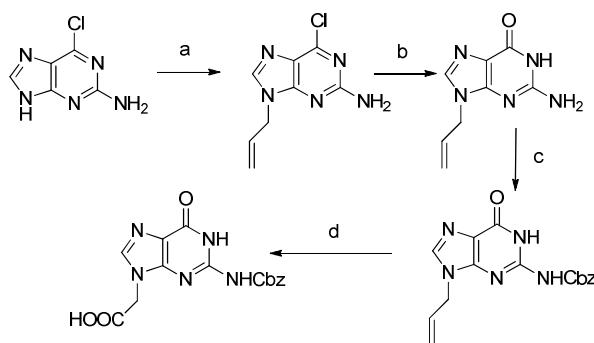


Esquema 31. Alquilación de bases nitrogenadas descrita por el grupo de Nielsen. a) $\text{BrCH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$, K_2CO_3 ; b) NaOH acuoso; c) $\text{PhCH}_2\text{OCOCl}$, piridina; d) $\text{BrCH}_2\text{CO}_2\text{Et}$, NaH ; e) $\text{PhCH}_2\text{OCOIm}^+\text{EtBF}_4^-$; f) BrCH_2COOH , K_2CO_3 ; g) PhCH_2ONa .

Por el contrario, los grupo amino exocíclicos del resto de las bases nitrogenadas requieren protección previa para prevenir la elongación de la cadena en esa posición o la acetilación durante el procedimiento de *capping* empleado en la oligomerización. Para la *citocina* (C), el grupo protector benciloxycarbonilo (CbZ ò Z) resultó ser el más apropiado (Esquema 31) en parte, porque su naturaleza lipofílica mejora considerablemente la solubilidad de esta base nitrogenada y su correspondiente monómero en los disolventes orgánicos en los que transcurren las reacciones de SPPS.

Para la *adenina* (A) se llevó a cabo en primer lugar la alquilación con bromoacetato de etilo en presencia de carbonato potásico o hidruro sódico, observándose tan sólo la sustitución en la posición 9. Posteriormente, se introdujo el grupo protector Cbz (Esquema 31). Si por el contrario, se llevaba a cabo en primer lugar la protección del grupo amino exocíclico, los rendimientos disminuían considerablemente ya que se obtenía una mezcla prácticamente equimolar de los productos alquilados en la posición 7 y en la posición 9.²²⁹

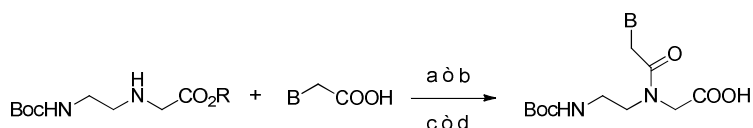
Dado que la *guanina* (G) no pudo ser alquilada para dar exclusivamente el isómero 9, como material de partida para la preparación del correspondiente monómero G se empleó la 2-amino-6-cloropurina. Visto que el cloro no aportaba las características de solubilidad necesarias para su posterior uso en reacciones orgánicas, fue sustituido por un grupo benciloxi (Esquema 31).²³⁰ Los numerosos intentos fallidos de proteger el grupo amino exocíclico con Cbz empleando diversos reactivos, llevaron a determinar que esta posición no requería protección alguna en la síntesis de oligómeros dada su falta de reactividad. Sin embargo, en el procedimiento de *capping* de la síntesis de oligómeros se observó acetilación parcial, por lo que se decidió evitar este paso para PNAs que contuvieran dicho residuo. La base nitrogenada G con el grupo amino exocíclico protegido como Cbz se describió por primera vez para su aplicación en protocolos Fmoc²²⁹, aunque también ha sido empleada en estrategias Boc.²³² La síntesis del derivado de guanina empleado para la posterior preparación de monómeros Fmoc o Boc (Esquema 33), se recoge en el siguiente esquema 32.



Esquema 32. Síntesis del derivado de guanina con el grupo amino exocíclico protegido como Cbz. a) Bromuro de alilo; b) HCl acuoso; c) Cbz-imidazol; d) O₃, CH₂Cl₂/MeOH.

Para la construcción de los correspondientes monómeros de protocolos Boc, las bases nitrogenadas anteriormente comentadas se unen al esqueleto de *N*-(2-Boc-aminoetil)glicina con su posición carboxílica protegida en forma de éster metílico o etílico, a través de diversas metodologías. Tras la formación del enlace amida, el ácido carboxílico se desprotege dando lugar al correspondiente monómero (Esquema 33).

²³² L. Christensen, R. Fitzpatrick, B. Gildea, K. H. Petersen, H. F. Hansen, T. Koch, M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, J. Coull, R. H. Berg, *J. Pept. Sci.*, **1995**, *1*, 175-183.



Esquema 33. Acoplamiento de las bases nitrogenadas al esqueleto. a) DCC, DhbtOH (B = T, N⁴-Cbz-C o N⁶-Cbz-A; R = Et); b) PyBrop, DIEA (B = O⁶-Bn-G; R = Me); c) LiOH, THF, H₂O (B = T, N⁴-Cbz-C o N⁶-Cbz-A; R = Et); d) NaOH, EtOH, H₂O (B = O⁶-Bn-G; R = Me).

Para la oligomerización de monómeros de PNA siguiendo una estrategia Boc, se han descrito diferentes protocolos,^{230, 231,232,233,234} basándose todos ellos en procedimientos estándar de síntesis en fase sólida y empleando una resina de poliestireno de 4-metilbenzhdrilamina (MBHA) como soporte sólido. De entre todas las condiciones probadas, las sales de uronio se constituyeron como los mejores agentes activantes para la formación del enlace amida. En concreto, los acoplamientos llevados a cabo con hexafluorofosfato de *O*-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU) fueron los que proporcionaron los mejores rendimientos.²³²

Una vez sintetizado el PNA en cuestión, se procede al *cleavage* o desanclado del mismo de la resina por tratamiento con HF anhidro o por procedimientos que emplean el ácido trifluorometanosulfónico (TFMSA), al igual que en la química de péptidos tradicional. Tras purificación mediante HPLC en fase reversa, estos oligómeros suelen ser solubles en agua, aunque al aumentar la longitud de la cadena y/o la relación purina:pirimidina, la solubilidad en medios acuosos tiende a disminuir.

Mediante esta metodología, se han descrito oligómeros de hasta al menos 20 residuos de longitud incorporando las cuatro bases nitrogenadas naturales. Así se han sintetizado un gran número de PNAs cuyas aplicaciones fundamentales se engloban en cuatro principales categorías: agentes en terapia antisentido y

²³³ M. Egholm, P. E. Nielsen, O. Buchardt, R. H. Berg, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 9677-9678.

²³⁴ M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardt, *Chem. Commun.*, **1993**, 800-801.

antigénica,^{235,236,237} herramientas en biología molecular y genómica funcional,^{238,239,240} pruebas de diagnóstico y detección,^{241,242} y biosensores.²⁴³

5.1.3. Peptide Nucleic Acids (PNAs) en las Terapias Antigénica y Antisentido. Efecto Antisentido de PNAs en el Crecimiento Bacteriano y su Potencial Aplicación en Biotecnología

En los últimos años, las terapias antisentido y antigénica han atraído un especial interés dentro de la química médica para el tratamiento de enfermedades a nivel de expresión génica. La interferencia con la expresión de un gen puede llevarse a cabo mediante unión de oligonucleótidos o análogos de oligonucleótidos al ADN o al ARN, siguiendo las reglas de pares de bases descritas por Watson y Crick o las reglas de Hoogsteen.

En una expresión genética normal, el ADN se transcribe en ARN *mensajero* (*mARN*) lo cual, tras un proceso de traducción, da lugar a múltiples copias de proteínas producto de un gen específico (Figura 82, a). En la estrategia antisentido, un oligonucleótido o análogo se une específicamente al *mARN* mediante puentes de hidrógeno, inhibiéndose la traducción del mismo en proteínas (Figura 82, b). Por el contrario en la terapia antigénica, es la transcripción la que se inhibe mediante la unión de un oligonucleótido o análogo al ADN. Este acoplamiento, debe darse mediante la formación de un *triplex* (reconocimiento de la doble cadena de ADN formándose enlaces de hidrógeno tipo Hoogsteen) o por desplazamiento de hebra (Figura 82, c).

²³⁵ V. V. Demidov, *Drug Discovery Today*, **2002**, 7, 153-155.

²³⁶ P. E. Nielsen, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1999**, 9, 353-357.

²³⁷ J. Hanvey, N. Peffer, J. Bisi, S. Thomson, R. Cadilla, J. Josey, D. Ricca, C. Hassman, M. Bonham, K. Au, a. et, *Science*, **1992**, 258, 1481-1485.

²³⁸ V. Demidov, M. D. Frank-Kamenetskii, M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, *Nucl. Acids Res.*, **1993**, 21, 2103-2107.

²³⁹ A. G. Veselkov, V. V. Demidov, P. E. Nielsen, M. D. Frank-Kamenetskii, *Nucl. Acids Res.*, **1996**, 24, 2483-2487.

²⁴⁰ H. Perry-O'Keefe, X.-W. Yao, J. M. Coull, M. Fuchs, M. Egholm, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1996**, 93, 14670-14675.

²⁴¹ H. Ørum, P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, C. Stanley, *Nucl. Acids Res.*, **1993**, 21, 5332-5336.

²⁴² V. V. Demidov, *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **2002**, 2, 199-201.

²⁴³ O. Brandt, J. D. Hoheisel, *Trends Biotechnol.*, **2004**, 22, 617-622.

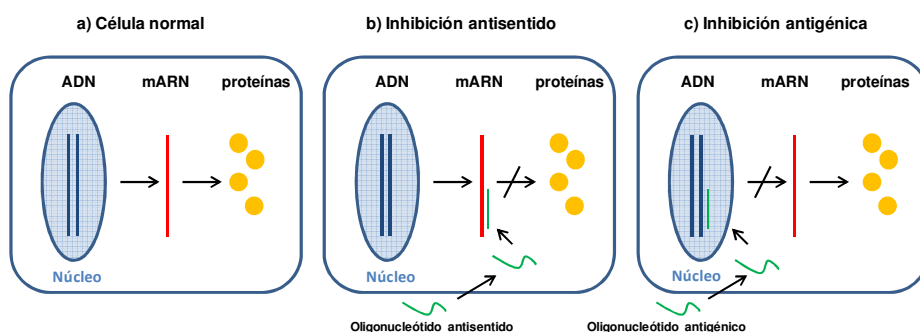


Figura 82. Ilustración esquemática de a) expresión genética normal; b) inhibición antisentido, y c) inhibición antigénica.

La tecnología antisentido inhibe la expresión génica de una manera dependiente de la secuencia. Esta técnica está siendo actualmente empleada en bioingeniería molecular y celular, así como en el diseño de antibióticos y nuevos métodos terapéuticos.^{244,245} El desarrollo de análogos de ácidos nucleicos, como PNAs, ha impulsado considerablemente el avance y la aplicabilidad de dicha tecnología gracias fundamentalmente a las ventajas que estos otorgan. Como se ha comentado anteriormente, los PNAs poseen atractivas propiedades entre las que se encuentran una alta estabilidad frente a nucleasas y proteasas,²²⁸ y una fuerte afinidad con hebras complementarias de ADN o ARN.²⁴⁶ Es por ello que entre otras aplicaciones, el uso de oligómeros antisentido como inhibidores de la traducción en el desarrollo de nuevos antibióticos ha sido especialmente estudiado en la última década.^{247,248,249,250}

A lo largo de los años se han desarrollado diferentes investigaciones utilizando PNAs antisentido o conjugados péptido-PNA dirigidos a mRNA de genes esenciales para la supervivencia bacteriana como *acpP*²⁵¹ (gen que codifica la proteína acil-transportadora (ACP, de *acyl carrier protein*),

²⁴⁴ L. K. Lee, C. M. Roth, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2003**, 14, 505-511.

²⁴⁵ L. Rasmussen, H. Sperling-Petersen, K. Mortensen, *Microb. Cell Fact.*, **2007**, 6, 24.

²⁴⁶ P. E. M. Nielsen, *Peptide nucleic acids. Protocols and applications*. Horizon Bioscience, Norfolk, **2004**, 1-36.

²⁴⁷ L. Good, P. E. Nielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1998**, 95, 2073-2076.

²⁴⁸ N. Nekhotiaeva, S. K. Awasthi, P. E. Nielsen, L. Good, *Mol. Ther.*, **2004**, 10, 652-659.

²⁴⁹ X.-X. Tan, J. K. Actor, Y. Chen, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2005**, 49, 3203-3207.

²⁵⁰ P. Kurupati, K. S. W. Tan, G. Kumarasinghe, C. L. Poh, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2007**, 51, 805-811.

²⁵¹ L. Good, S. K. Awasthi, R. Dryselius, O. Larsson, P. E. Nielsen, *Nat Biotechnol*, **2001**, 19, 360-364.

fundamental en la síntesis de ácidos grasos) o *fabI*²⁵² (gen que codifica la *enol-ACP reductasa* (ENR), enzima clave que cataliza el último paso en el ciclo de elongación de ácidos grasos). Estos experimentos se han focalizado en cepas patogénicas de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, o no patogénicas como *Escherichia coli*, y han demostrado que los PNAs que reconocen *mARN* inhiben la expresión génica y el crecimiento bacteriano de una manera específica de la secuencia.^{251,253,254}

A pesar de todas las ventajas que conlleva el uso de PNAs en terapias antisentido, la internalización de los mismos continua siendo la mayor limitación en su utilización como antibióticos debido fundamentalmente, a la falta de permeabilidad de la membrana exterior bacteriana.^{255,256} En concreto, para bacterias Gram-negativas, esta membrana lipopolisacáridica es el principal obstáculo en la penetración de PNAs. Con el fin de mejorar la entrada de estos miméticos de ADN en el interior de las bacterias objetivo, se han sintetizado oligonucleótidos unidos a péptidos permeabilizantes como KFFKFFKFFK. Esta secuencia ha demostrado actuar como transportador catiónico de oligómeros antisentido.^{251,257} Un estudio de Tan y colaboradores²⁴⁹ demostró que un conjugado péptido-PNA (KFFKFFKFFK-CTATACTCT) dirigido al *mARN* que codifica la proteína esencial *acpP* (*anti-acpP*), poseía propiedades bactericidas en *E. coli* a concentraciones de nanomolar a bajo micromolar en modelos de infección en ratón. A pesar de que el mecanismo de permeabilización de membrana por parte de esta secuencia peptídica es controvertido, las propiedades antisentido de PNAs mejoran considerablemente cuando ésta se les une, por lo que dicha estrategia ha sido aplicada a la mayoría de los PNAs antibacterianos desarrollados hasta la fecha.

Otra de las desventajas de los PNAs es que en ocasiones, presentan una baja solubilidad en medios fisiológicos. En este sentido, su conjugación a sistemas que le confieran un carácter más hidrofílico podría mejorar considerablemente sus propiedades farmacológicas. El uso de glicodendrones como los descritos en nuestro grupo de investigación, podría constituir una buena estrategia en la

²⁵² R. J. Heath, N. Su, C. K. Murphy, C. O. Rock, *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 40128-40133.

²⁵³ R. Dryselius, N. Nekhotiaeva, L. Good, *J. Antimicrob. Chemother.*, **2005**, 56, 97-103.

²⁵⁴ A. Nikraves, R. Dryselius, O. R. Faridani, S. Goh, M. Sadeghizadeh, M. Behmanesh, A. Ganyu, E. J. Klok, R. Zain, L. Good, *Mol Ther*, **2007**, 15, 1537-1542.

²⁵⁵ H. Nikaido, *Science*, **1994**, 264, 382-388.

²⁵⁶ L. Good, R. Sandberg, O. Larsson, P. E. Nielsen, C. Wahlestedt, *Microbiology*, **2000**, 146, 2665-2670.

²⁵⁷ M. Eriksson, P. E. Nielsen, L. Good, *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 7144-7147.

mejora de la solubilidad de PNAs, haciendo posible su uso como potenciales antibióticos.

La conjugación de glicodendrones de manosa podría tener en este caso una doble función, por un lado aumentar la solubilidad de los PNAs en medios acuosos y por otro, servir para el estudio de interacciones de carbohidratos con lectinas bacterianas. La existencia de lectinas en la superficie de bacterias es ampliamente conocida, jugando un papel fundamental en el proceso de infección.²⁵⁸ Por ejemplo, *E. coli* posee lectinas específicas de manosa que principalmente median en la iniciación de la infección, aunque también intervienen en la unión a células fagocíticas en ausencia de opsoninas, desencadenando la ingestión y erradicación de dicha bacteria. Este proceso, conocido como lectinofagocitosis, es de especial importancia en la eliminación de bacterias en pacientes no inmunes o en puntos pobres en opsoninas, como la médula renal o la cavidad peritoneal.²⁵⁹

Teniendo en cuenta la presencia de lectinas en la superficie de la pared bacteriana, el uso de glicodendrones podría jugar un papel importante como vector director de PNAs hacia una diana terapéutica concreta. Asimismo, se podría estudiar si la interacción de dichas lectinas con sistemas multivalentes de manosa desencadena o no un proceso de internalización, favoreciendo a su vez la entrada del PNA antisentido en el interior de la bacteria.

El desarrollo de este proyecto surgió a partir de una colaboración con el grupo del Profesor Maiorana de la Università degli Studi di Milano en Italia, incluyendo una estancia breve en su laboratorio. Este grupo lleva años trabajando en el desarrollo y síntesis de PNAs para su aplicación en el diseño de biosensores con potencial uso en diagnóstico^{260,261,262} o en la mejora de la internalización de dichos sistemas.²⁶³ En relación a esta última aplicación, el grupo del Profesor Maiorana diseñó PNAs funcionalizados con complejos dinucleares de rutenio (I) dando lugar a estructuras con propiedades

²⁵⁸ N. Sharon, H. Lis, *Glycobiology*, **2004**, *14*, 53R-62R.

²⁵⁹ I. Ofek, N. Sharon, *Infect. Immun.*, **1988**, *56*, 539-547.

²⁶⁰ C. Baldoli, C. Rigamonti, S. Maiorana, E. Licandro, L. Falciola, P. R. Mussini, *Chem. Eur. J.*, **2006**, *12*, 4091-4100.

²⁶¹ G. Prencipe, S. Maiorana, P. Verderio, M. Colombo, P. Fermo, E. Caneva, D. Prosperi, E. Licandro, *Chem. Commun.*, **2009**, *0*, 6017-6019.

²⁶² C. Baldoli, P. Cerea, C. Giannini, E. Licandro, C. Rigamonti, S. Maiorana, *Synlett*, **2005**, *2005*, 1984-1994.

²⁶³ E. Ferri, D. Donghi, M. Panigati, G. Prencipe, L. D'Alfonso, I. Zanoni, C. Baldoli, S. Maiorana, G. D'Alfonso, E. Licandro, *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 6255-6257.

notablemente mejoradas tales como fotoestabilidad, ausencia de citotoxicidad, rápida internalización en células vivas en presencia de muy poca cantidad de DMSO y capacidad de teñir con diferentes colores el núcleo y el citoplasma, lo cual sugiere un potencial uso como marcador de diferentes grados de lipofilia o rigidez dentro de una misma célula. Sistemas de este tipo fueron descritos por primera vez en dicho laboratorio, lo cual abre nuevas perspectivas en las aplicaciones biológicas de los PNAs.

5.2. Objetivos

Teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente, se pretende diseñar sistemas híbridos constituidos por un glicodendrón nonavalente de manosa **10**, descrito anteriormente, y diferentes secuencias de PNA.

En concreto, se han elegido dos secuencias antisentido que inhiben la traducción de dos proteínas esenciales de *Escherichia coli*:

- ✓ Secuencia *anti-fabI* (CTCATACTCT, del $N' \rightarrow C'$), que inhibe la traducción de la proteína *enoil-ACP reductasa*.
- ✓ Secuencia *anti-acpP* (CCCATAGCTT, del $N' \rightarrow C'$), que evita la biosíntesis de la proteína *acil-transportadora*.

Para ello, se llevará a cabo la síntesis en fase sólida de ambas secuencias, utilizando métodos estándar manuales de la síntesis de péptidos y protocolos Boc. Dichas secuencias, deberán ser adecuadamente funcionalizadas para su posterior conjugación *via* cicloadición 1,3-dipolar entre azidas y alquinos (CuAAC). Además, se pretende conjugar un marcador fluorescente para observar la posible internalización de estos sistemas en la bacteria, mediante técnicas como la citometría de flujo o la microscopía confocal.

Se desea estudiar también la actividad antimicrobiana evaluando el crecimiento de *E.coli* a través de la absorbancia a 600 nm en presencia de los compuestos sintetizados, calculando el porcentaje de inhibición en relación a la concentración.

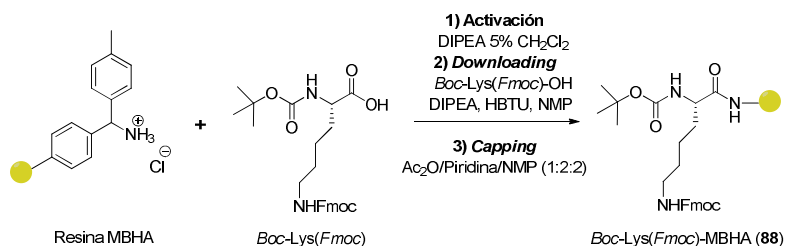
5.3. Síntesis de Conjugados PNA para su Potencial Aplicación en el Diseño de Agentes Antisentido

5.3.1. Síntesis de Secuencias de PNA adecuadamente Funcionalizadas para su Posterior Conjugación *via* CuAAC

Para la síntesis de las secuencias de PNAs se eligió una metodología estándar de síntesis en fase sólida empleando protocolos Boc²⁶⁴ y grupos protectores con diferente labilidad (por ejemplo Boc/Cbz) u ortogonales (Boc/Fmoc).

Como soporte sólido se eligió el más comúnmente empleado en la síntesis de PNAs, que consiste en una resina de poliestireno con grupos 4-metil benzhidrilamina (resina MBHA). El número de grupos amino por cada partícula de resina es normalmente muy elevado para la síntesis de PNAs, por lo que habitualmente es necesario un paso previo de reducción de la sustitución del soporte sólido (*downloading*) para evitar la agregación de oligómeros. El proceso de *downloading* normalmente reduce dicha sustitución desde 0.6 mmol por gramo de resina a 0.05-0.10 mmol/g.

En nuestro caso, el *downloading* se llevó desde 0.6 a 0.2 mmol/g, utilizando para ello un residuo de lisina adecuadamente protegido (Boc-Lys(Fmoc)), tal y como se recoge en el siguiente esquema.



Esquema 34. *Downloading* de la resina MBHA con el amino ácido Boc-Lys(Fmoc).

Para ello, la resina MBHA se transfirió a una jeringa de síntesis en fase sólida y se dejó expandir en CH₂Cl₂. Dicho disolvente es muy efectivo en la dilatación de este tipo de resinas, haciendo más accesibles las posiciones reactivas de la superficie del soporte sólido. Por tanto, éste debe ser siempre un paso previo a la conjugación de un monómero determinado, aumentando de esta forma el rendimiento de la oligomerización.

²⁶⁴ G. W. Anderson, A. C. McGregor, *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, 79, 6180-6183.

Una vez transcurrido el tiempo de expansión de la resina, tras activación con DIPEA, se acopló el residuo de Boc-Lys(Fmoc)-OH en una proporción tal que diese lugar a una sustitución en la resina de 0.2 mmol/g (Esquema 34). En los protocolos originales de la síntesis de PNAs, la activación de los monómeros se llevaba a cabo mediante carbodiimidas o mediante el uso de monómeros activados con Pfp (pentafluorofenilo). Posteriormente, estos protocolos fueron optimizados mediante la adición de sales de uronio como HBTU o HATU como agentes activantes. En estos estudios se concluyó que la activación mediante HATU daba, como media, los acoplamientos más efectivos y por tanto, es el más recomendado en la síntesis de PNAs.²³² En nuestro caso, como agente activante en el proceso de *downloading* se empleó la sal de uronio HBTU.

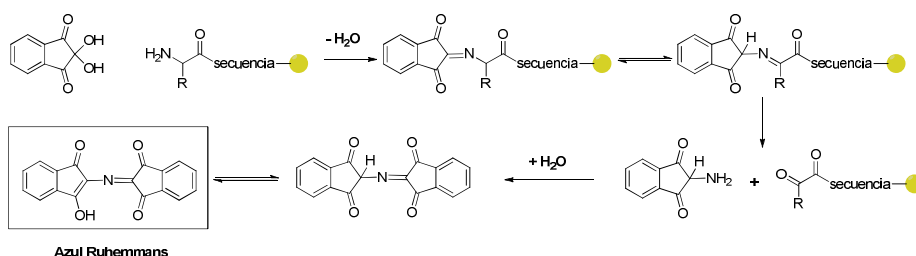
Por otro lado, el disolvente empleado para el acoplamiento es también crítico para llevar a cabo con éxito la síntesis de este tipo de oligómeros. Se ha demostrado que el uso de disolventes polares apróticos que tengan capacidad donadora de electrones como la *N*-metilpirrolidona (NMP) son óptimos en la síntesis de PNAs. Se recomienda una breve pre-activación del monómero y un mínimo exceso de base en los procesos de neutralización *in situ*.

Una vez finalizada la reacción, se llevó a cabo el proceso de *capping*. Este paso consiste en acetilar los grupos amino libres de la resina para evitar la elongación de la cadena en dichas posiciones. El agente de *capping* más utilizado es el anhídrido acético, siendo éste tan efectivo que da lugar a reacciones completas en menos de 1 minuto, incluso empleando disoluciones al 2%. Las especies *acetil-base nitrogenada* formadas durante el *capping* son estables en medio ácido, por lo que son capaces de soportar las condiciones de desprotección que tienen lugar en el crecimiento de la cadena. El *capping* se llevó a cabo utilizando una disolución de NMP/Piridina/Ac₂O (2:2:1).

Tras este paso, se realizó el test de Kaiser para asegurarse de que todos los grupos amino libres de la resina habían sido acetilados. El test de Kaiser es un test colorimétrico muy empleado en la monitorización de reacciones entre aminoácidos en la síntesis en fase sólida, por detección de grupos amino libres. La reacción de aminas primarias libres con ninhidrina genera un color azul intenso, lo cual se puede utilizar para evaluar la completa protección o no de las posiciones reactivas soportadas en la resina (Esquema 35).^{265,266}

²⁶⁵ E. Kaiser, R. L. Colosco, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.*, **1970**, *34*, 595-598.

²⁶⁶ V. K. Sarin, S. B. H. Kent, J. P. Tam, R. B. Merrifield, *Anal. Biochem.*, **1981**, *117*, 147-157.



Esquema 35. Esquema de reacción de la ninhidrina con aminas primarias (Test de Kaiser).

Una vez comprobado que no quedaban posiciones reactivas libres, la resina se secó a vacío y se comprobó el nivel de sustitución en el proceso de *downloading* mediante espectroscopía ultravioleta-visible (UV-vis), midiendo la absorción a 290 nm del grupo Fmoc desprotegido ($\epsilon = 1.65 \text{ mL}/(\mu\text{mol} \times \text{cm})$), a través de la ley de Lambert-Beer.

Tras el proceso de *downloading*, se inició la síntesis en fase sólida de las dos secuencias de PNA comenzando por el extremo *C*-terminal. Para ello se emplearon los monómeros comerciales de timina, adenina, guanina y citosina protegidos en su extremo *N*-terminal con un grupo Boc y en los grupos amino exocíclicos con un grupo Cbz (Boc-T-OH, Boc-A(Cbz)-OH, Boc-G(Cbz)-OH y Boc-C(Cbz)-OH, respectivamente). Para la oligomerización paso a paso de los PNAs se siguieron protocolos estándar en fase sólida para ambas secuencias: *anti-fabI* (CTCATACTCT) y *anti-acpP* (CCCATAGCTT) (Figura 83).

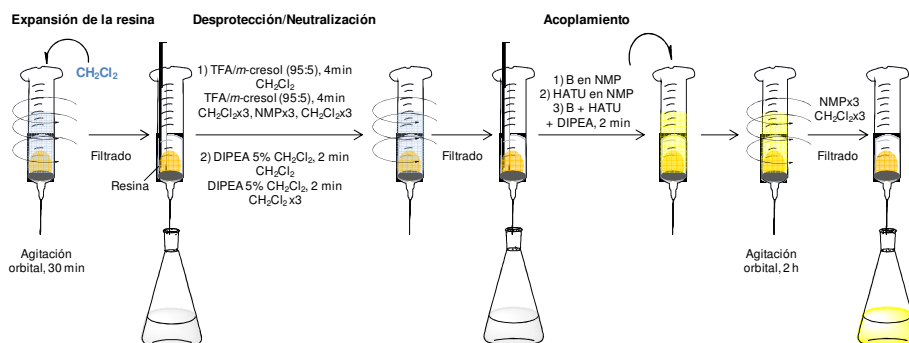


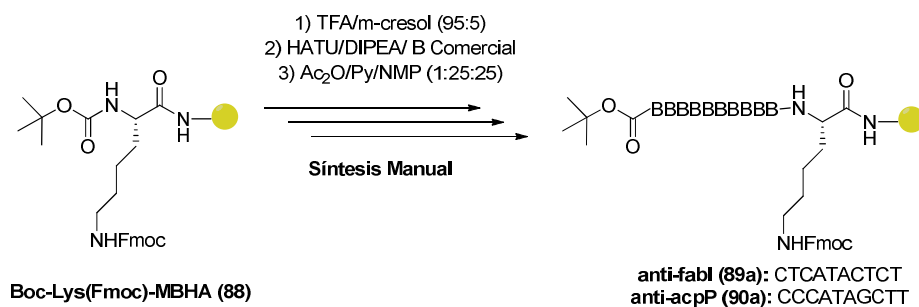
Figura 83. Protocolo para la adición de cada monómero al soporte sólido.

El primer paso en cada adición de monómero al soporte sólido es la desprotección del grupo Boc. Este grupo se elimina mediante adición de ácido trifluoroacético (TFA) y algún *scavenger* que reaccione con los cationes de *t*-butilo que se liberan en la desprotección. En este protocolo, se utilizó el *m*-

cresol, el cual es capaz de reducir significativamente la alquilación de las base nitrogenadas por *t*-butilo. La desprotección mediante TFA es rápida y transcurre de manera completa en torno a los cinco minutos. Tras tratamiento con TFA, la resina se lavó con combinaciones de CH_2Cl_2 y NMP para eliminar restos de manera efectiva. En general, los lavados más eficientes para la resina MBHA tienen lugar cuando se combinan disolventes con propiedades distintas. Tal y como se ha comentado anteriormente, el CH_2Cl_2 es un disolvente muy efectivo en la expansión de la resina, por el contrario, los disolventes polares apróticos como NMP, DMF, DMSO, etc. tienden a contraerla. Por ello, la combinación de ciclos de expansión/contracción mediante lavado alternativo de la resina con CH_2Cl_2 y NMP respectivamente, conducen a la eliminación de subproductos de una manera eficiente.

Tras la eliminación del grupo protector, se neutralizó con una disolución de DIPEA al 5% en CH_2Cl_2 y se procedió al acoplamiento del monómero en cuestión, empleando como agente activante HATU. Las velocidades de reacción entre las diferentes combinaciones de pares de bases suelen ser por lo general rápidas, aunque los acoplamientos sobre residuos de adenina son ligeramente más lentos con respecto a los acoplamientos sobre residuos de timina, citosina o guanina. Aún así, un tiempo de reacción de 2 horas asegura prácticamente el acoplamiento cuantitativo para todas las combinaciones de bases.

Una vez finalizado el acoplamiento del monómero, se procedió a la etapa de *capping* para truncar las cadenas que no han reaccionado y evitar el crecimiento de la secuencia en dichas posiciones. La repetición iterativa de estos pasos, llevó a la obtención de las secuencias deseadas, tal y como se recoge en el siguiente esquema.



Esquema 36. Síntesis manual iterativa de las secuencias de PNA *anti-fabI* (89a) y *anti-acpP* (90a). B: base nitrogenada.

Para ir comprobando el transcurso de la síntesis, cada cierto número de acoplamientos se llevaron a cabo desanclajes (*cleavages*) de pequeñas porciones de la resina, siguiendo el proceso mediante HPLC en fase reversa y espectrometría de masas (MALDI-TOF)(Figura 84).

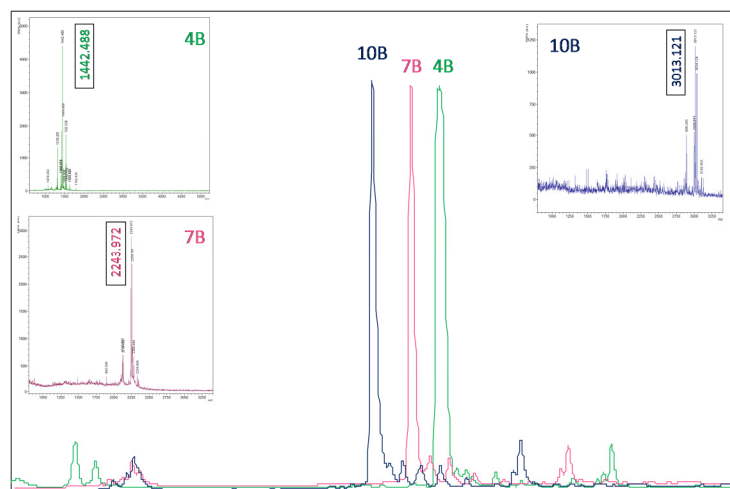
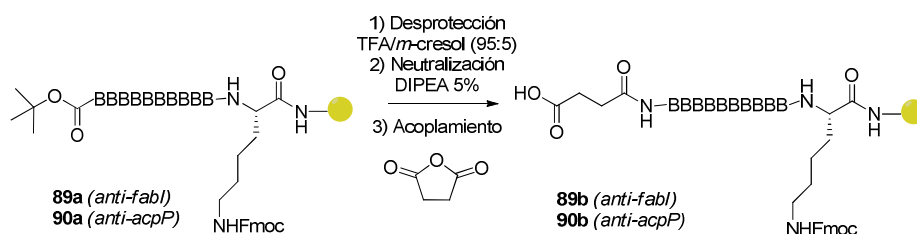


Figura 84. Seguimiento por HPLC y espectrometría de masas (MALDI-TOF) de la síntesis en fase sólida de la secuencia de *anti-fabI* por *cleavage* de la resina a las 4 (4B), 7 (7B) y 10 (10B) bases.

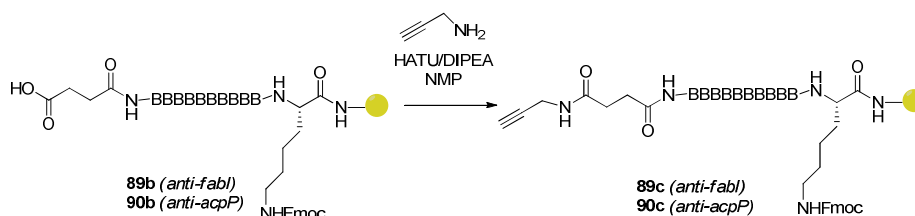
Sintetizadas ambas secuencias, se procedió a la funcionalización del extremo *N*-terminal del PNA para poder conjugarlo posteriormente mediante *química click*. Para ello, en primer lugar se desprotegió el grupo Boc por adición de una disolución de TFA/*m*-cresol (95:5), tras lo cual se neutralizó con DIPEA en CH_2Cl_2 al 5% en volumen. Posteriormente, el grupo amino primario resultante se funcionalizó con un ácido carboxílico por reacción con anhídrido succínico mediante formación de enlace amida (Esquema 37).



Esquema 37. Funcionalización del extremo *N*-terminal con un ácido carboxílico empleando anhídrido succínico. B: base nitrogenada.

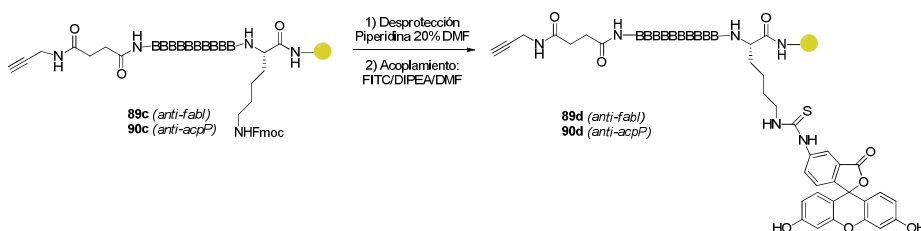
El grupo alquino necesario para la conjugación de los PNAs *via* CuAAC, se introdujo por formación de un enlace amida entre el ácido carboxílico de las

resinas **89b** y **90b** y la propargil amina, empleando como agente activante HATU (Esquema 38). En este punto, se llevó a cabo un *cleavage* de una pequeña porción de resina para controlar el proceso mediante HPLC y masas (MALDI-TOF), obteniéndose cromatogramas y espectros de masas prácticamente limpios.



Esquema 38. Funcionalización del extremo *N*-terminal con un grupo alquino, necesario para la posterior conjugación *via* CuAAC.

Tras la adecuada funcionalización del extremo *N*-terminal, se procedió a la introducción de un fluoróforo en el grupo amino del residuo de lisina del extremo *C*-terminal. De esta manera, se podría estudiar la internalización de los PNAs mediante técnicas como citometría de flujo o espectroscopía confocal. Para ello, primero se desprotegió el grupo Fmoc de la cadena lateral del residuo lisínico con una disolución de piperidina al 20% en DMF (Esquema 39).

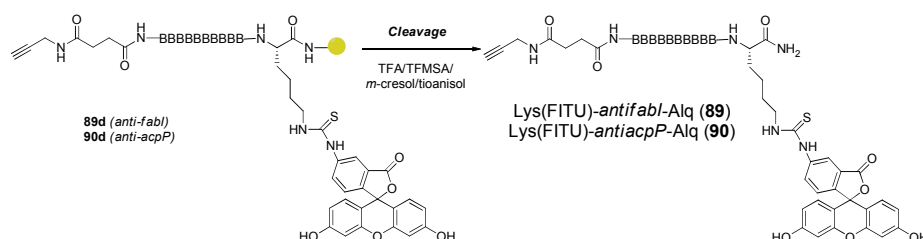


Esquema 39. Funcionalización del extremo *C*-terminal con un grupo fluoróforo.

Como fluoróforo se eligió la fluoresceína en forma de fluoresceína isotiocianato (isómero I), la cual se hizo reaccionar con el grupo amino primario de la lisina desprotegida mediante formación de un enlace tiourea.

Una vez finalizada la síntesis en fase sólida, se llevó a cabo el *cleavage* de la secuencia de PNA (Esquema 40). Para ello, se empleó una disolución de TFA/TFMSA/*m*-cresol/tioanisol (6:2:1:1, v/v). Tras el tiempo de *cleavage*, la disolución se recogió en un tubo de centrifuga y se eliminaron los volátiles

mediante flujo de nitrógeno hasta obtener una especie de aceite de color negro. En este momento, se añadió Et₂O frío para precipitar la secuencia de PNA.



Esquema 40. Cleavage total de la resina para la obtención de las secuencias funcionalizadas de PNAs *anti-fabI* y *anti-acpP* **89** y **90**, respectivamente.

El crudo así obtenido, se purificó utilizando RP-HPLC, dando lugar a ambas secuencias apropiadamente funcionalizadas con rendimientos moderados (17% para *anti-fabI* y 15% para *anti-acpP*). La pureza de dichos compuestos se comprobó mediante HPLC y espectroscopía de masas MALDI-TOF (Figura 85).

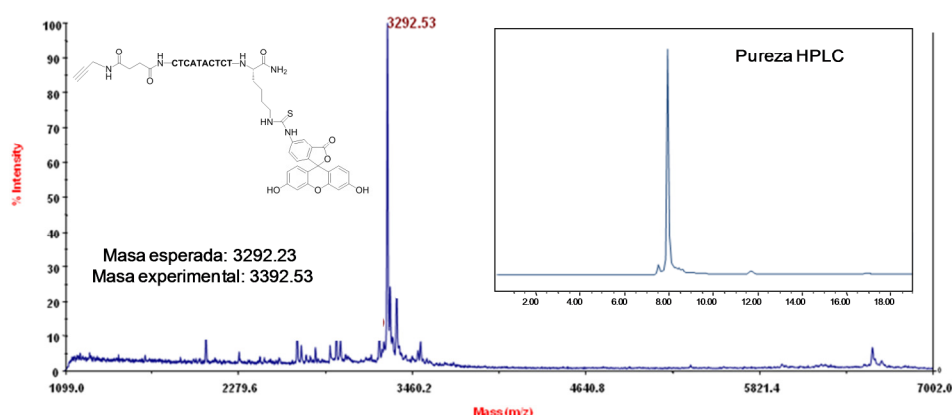


Figura 85. Espectro de masas MALDI-TOF de la secuencia de *anti-acpP* (**90**) funcionalizada y cromatograma tras purificación en RP-HPLC.

5.3.2. Síntesis del Control Negativo de Etilenglicol

Una vez preparadas las secuencias de PNA, se procedió a la síntesis de un control negativo. Para demostrar que la posible internalización de PNAs es debida a la interacción del glicodendrón **10** con los receptores de manosa de la superficie de *E. coli*, era necesario sintetizar los controles negativos oportunos. Para ello, se pensó en utilizar un glicodendrón noavalente

funcionalizado con unidades de etilenglicol en lugar de carbohidratos (Figura 86).

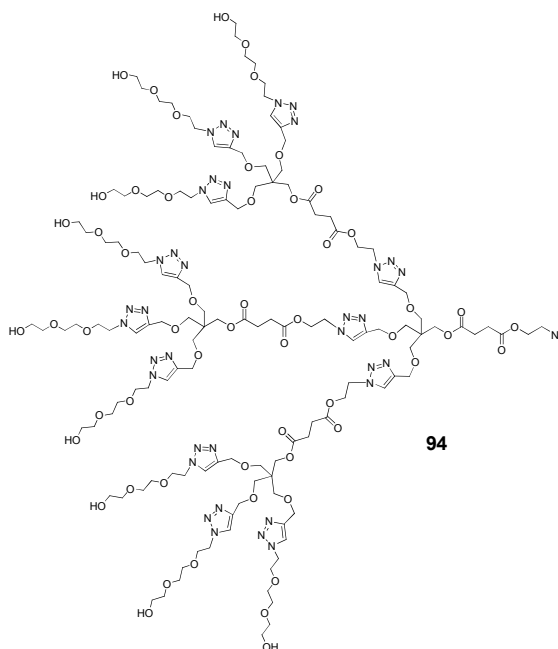
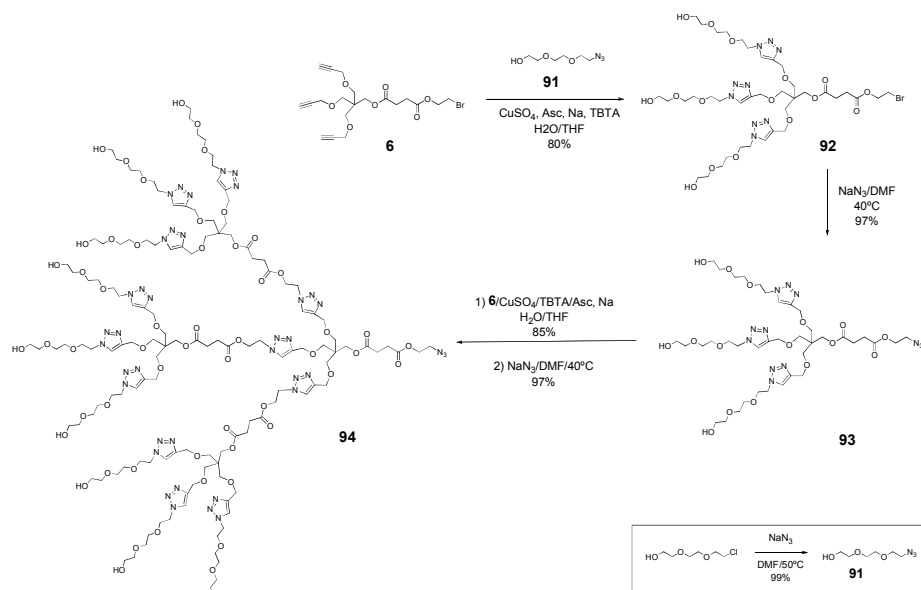


Figura 86. Control negativo novalente de etilenglicol **94**.

Para la síntesis de dicho dendrón se escogió la misma metodología descrita para los glicodendrones de manosa (Esquema 41). Como núcleo de crecimiento se eligió el compuesto **6** y como unidad de ramificación un derivado de trietilenglicol con un grupo azida en uno de sus extremos (**91**), preparado según está descrito en la literatura a partir del 2-[2-(2-cloroetoxi)eto]etanol.²⁶⁷ Mediante CuAAC se llevó a cabo la formación del dendrón trivalente **92** (Esquema 41). La reacción transcurrió a temperatura ambiente utilizando $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ como fuente de cobre, ascorbato sódico y TBTA, tal y como se ha descrito en ocasiones anteriores. Como disolvente, se empleó una mezcla de THF/ H_2O en una proporción 1:1 (v/v).

²⁶⁷ J. Li, S. Zacharek, X. Chen, J. Wang, W. Zhang, A. Janczuk, P. G. Wang, *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, 7, 1549-1558.



Esquema 41. Ruta sintética basada en la CuAAC para la obtención del dendrón de etilenglicol **94**.

Una vez finalizada la reacción, el cobre se extrajo del medio por adición de la resina QuadraSil[®] MP. Tras varios minutos en agitación, dicha resina se filtró y se procedió a la purificación del crudo mediante cromatografía de exclusión de tamaño LH-20 (MeOH, 100%). El derivado trivalente **92** se obtuvo con buen rendimiento (80%). La completa funcionalización del núcleo, se corroboró mediante la correcta integración de las señales características del correspondiente espectro de ¹H-RMN y por espectrometría de masas (Figura 87), donde se podía observar claramente el perfil isotópico del Br.

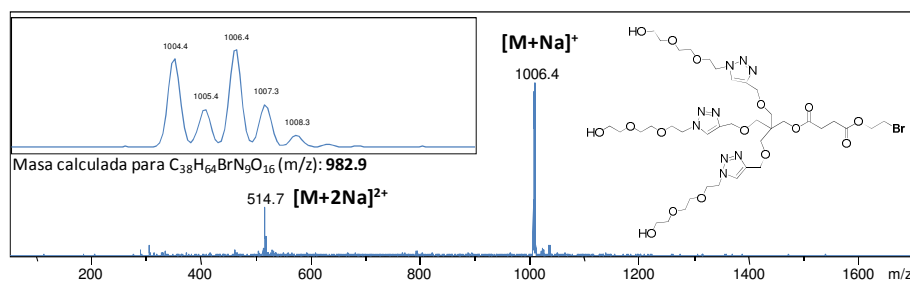


Figura 87. Espectro de masas (ESI) del glicodendrón trivalente **92**.

La sustitución del bromo por un grupo azida se llevó a cabo a 40°C con NaN₃ en DMF anhidra, dando lugar a la formación del dendrón trivalente **93** con excelentes rendimientos (97%). La total desaparición del Br se comprobó

tanto por espectrometría de masas (ESI) como por ^1H -RMN, observándose el desplazamiento de las señales de los protones del grupo metileno en β de 4.37 (flecha roja) a 4.23 ppm (flecha verde) en una zona limpia del espectro (Figura 88).

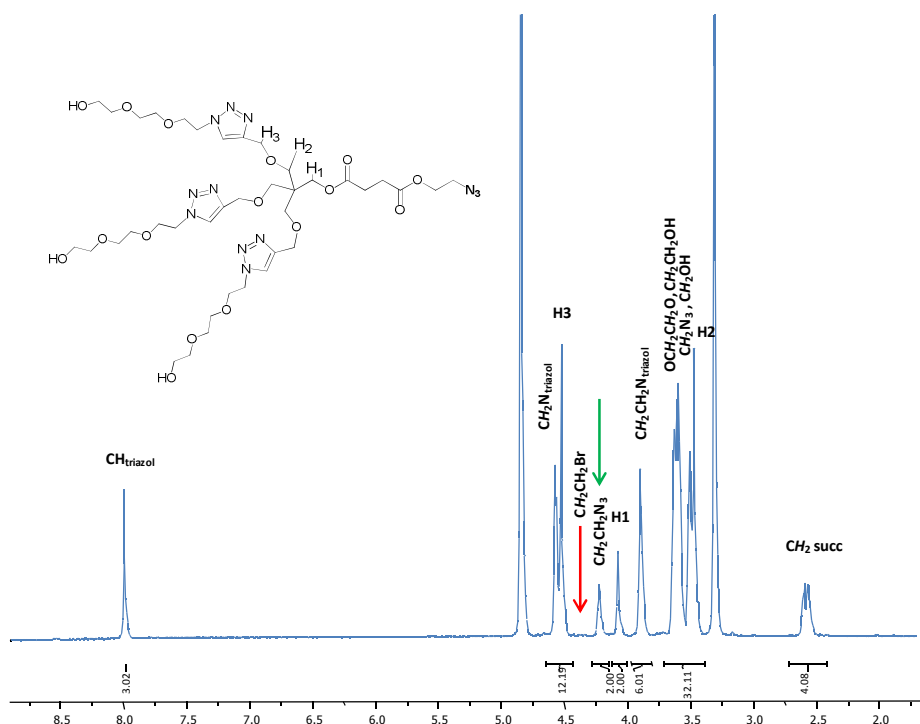


Figura 88. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, CD_3OD) del dendrón de etilenglicol **93**.

El dendrón trivalente **93** se hizo crecer a la siguiente generación por reacción con el núcleo **6** mediante CuAAC. La posterior sustitución de Br por azida en las mismas condiciones comentadas anteriormente, dio lugar al dendrón **94** con buen rendimiento tras purificación mediante cromatografía de exclusión por tamaño G-25 ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$, 9:1). La monodispersidad y la integridad de este compuesto se demostraron satisfactoriamente mediante ^1H -RMN (Figura 89) y espectrometría de masas.

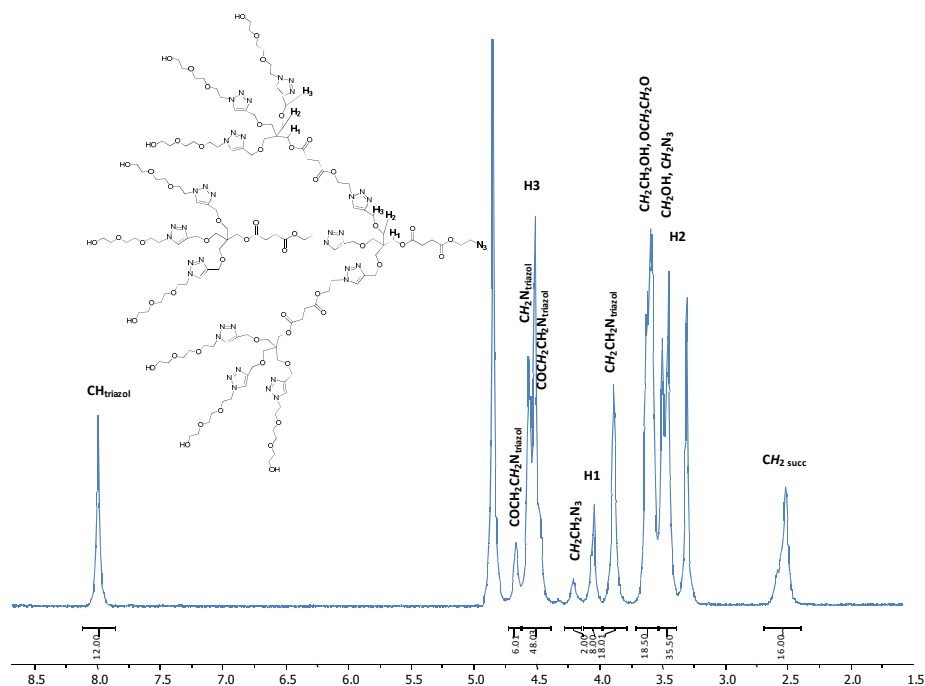
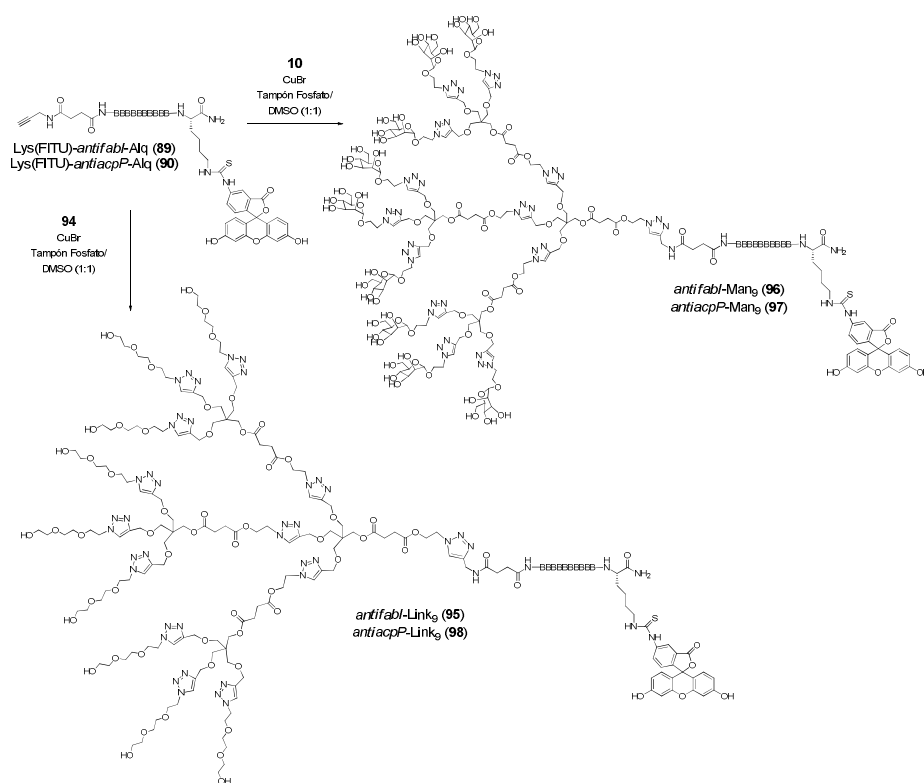


Figura 89. Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD) del dendrón de etilenglicol **94**.

5.3.3. Síntesis de Conjugados PNA-Glicodendrón y PNA-Control Negativo

Tras la preparación de todos los intermedios necesarios, se llevaron a cabo las conjugaciones de ambas secuencias de PNA (**89** y **90**) tanto con el glicodendrón nonavalente **10** como con el dendrón **94**.



Esquema 42. Síntesis de los conjugados de dendrón novalente-PNA **95-98**

En este paso, la etapa limitante fue la búsqueda de un disolvente apropiado para llevar a cabo la conjugación, ya que los PNAs no son del todo solubles en medios acuosos y tienden a precipitar en el transcurso de la reacción en los disolventes empleados anteriormente. Con el fin de optimizar las condiciones de reacción, se probaron diferentes mezclas de disolventes recogidos en la tabla 10, encontrándose los mejores resultados de solubilidad para una mezcla de tampón fosfato (pH 7.4, 25 mM)/DMSO (1:1, v/v). El tampón fosfato asegura las condiciones de pH necesarias para que tenga lugar la reacción *click*.

Entrada	Disolvente	Proporción	Solubilidad
1	H ₂ O/THF	1:1	Precipita
2	H ₂ O/ACN	1:1	Precipita
3	H ₂ O/ <i>t</i> -BuOH	1:1	Precipita
4	H ₂ O/ <i>t</i> -BuOH/DMSO	2:2:1	Precipita
5	H ₂ O/DMSO	2:1	Precipita
6	H ₂ O/DMSO	1:1	No precipita
7	Tampón fosfato/DMSO	1:1	No precipita

Tabla 10. Mezclas de disolventes probadas para la conjugación de PNAs y dendrones de manosa o etilenglicol *vía* CuAAC.

Encontrada la mezcla de disolventes apropiada para llevar a cabo la cicloadición 1,3-dipolar, se decidió probar en primer lugar CuBr como fuente de cobre sin adición del ligando TBTA, para evitar la mezcla de reactivos en el crudo de reacción y facilitar así la purificación. Se empleó para ello un gran exceso de catalizador adicionándose a la mezcla de reacción en porciones de 2.5 equivalentes cada una, hasta completar la reacción. En todos los ejemplos, fueron necesarios 10 equivalentes de CuBr para finalizar la conjugación, transcurriendo todas ellas en aproximadamente 4 horas.

La primera reacción en llevarse a cabo fue la conjugación entre el dendrón nonavalente **94** y la secuencia de PNA *anti-fabI* **89**. Tras adición de 10 equivalentes de CuBr y 4 horas de reacción, la conjugación se completó, tal y como se pudo observar por RP-HPLC (Figura 90). En el cromatograma se ve como el dendrón **94** (en defecto), desaparece completamente tras cuatro horas de reacción, apareciendo un nuevo pico a $t_r = 34.5$ min, correspondiente al conjugado de PNA **95**.

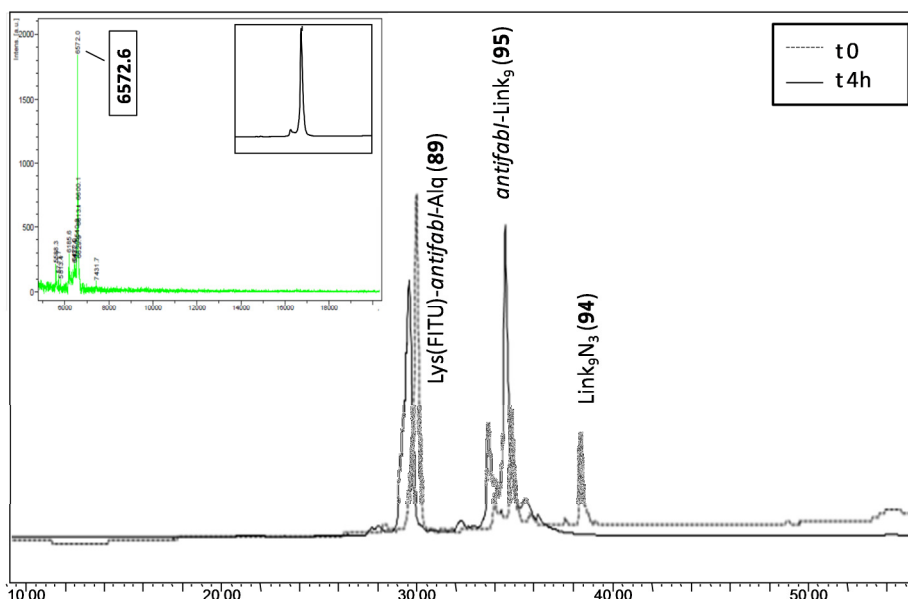


Figura 90. Seguimiento de la reacción entre el control negativo **94** y la secuencia de PNA **89** para dar el conjugado **95**. Tras purificación por HPLC, se caracterizó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, obteniéndose el espectro recogido en la figura (Masa esperada: 6571.2, Masa obtenida: 6572.6 [M+H]⁺).

El crudo de reacción se purificó mediante HPLC en fase reversa, obteniendo el conjugado **95** con un rendimiento del 22%, el cual fue calculado mediante absorción en UV a 260 nm para un coeficiente de extinción molar de 91.3 mL/(μmol×cm) ($\epsilon_{anti-fabI} = 2\epsilon_{A(260)} + 4\epsilon_{C(260)} + 3\epsilon_{T(260)} + \epsilon_{G(260)}$), a través de la Ley de Lambert-Beer.

Visto que la reacción de cicloadición 1,3-dipolar transcurría satisfactoriamente en un tiempo razonable tan sólo por adición de CuBr, se utilizó la misma metodología para la síntesis del resto de los sistemas dendrón-PNA. De esta manera se llegó a los glicoconjugados **96** (*antifabI*-Man₉) y **97** (*antiacpP*-Man₉), con rendimientos moderados tras purificación por HPLC en fase reversa (10% y 22%, respectivamente), los cuales se caracterizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Ejemplo en figura 91). Las cantidades obtenidas para cada glicoconjugado se calcularon mediante absorción en UV a 260 nm ($\epsilon_{anti-fabI} = 91.3$ mL/(μmol×cm); $\epsilon_{anti-acpP} = 88.2$ mL/(μmol×cm)).

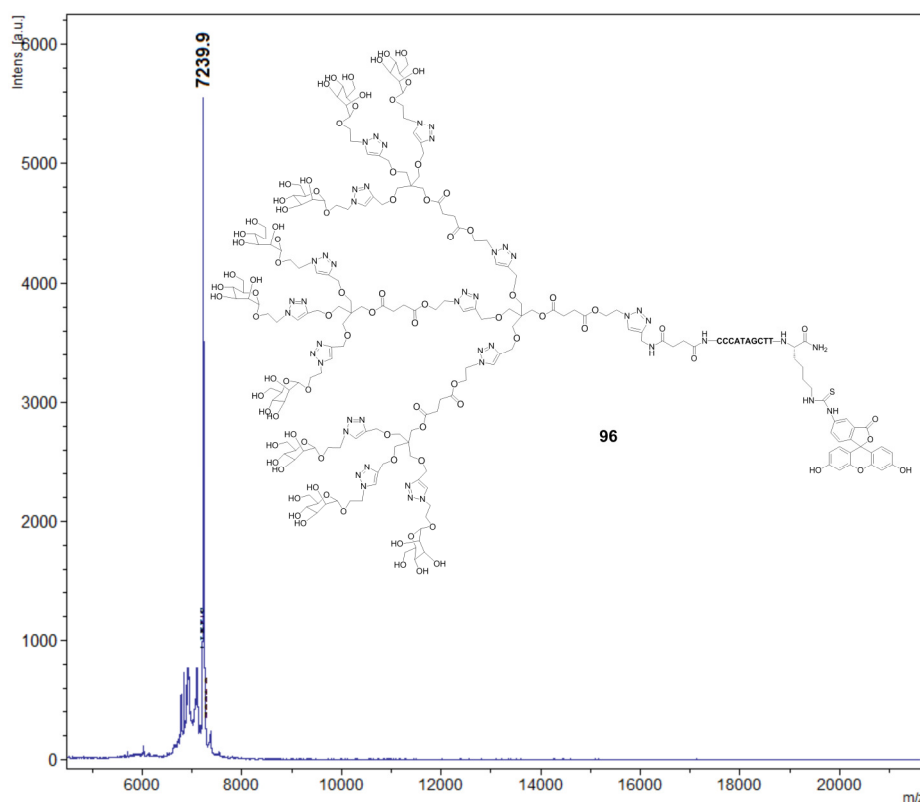


Figura 91. Espectro de masas MALDI-TOF para el glicoconjugado **96** (*antifabI-Man*₉). La masa esperada para dicho compuesto es 7238.7. En el espectro podemos observar el pico correspondiente a $[M+H]^+$.

Para el caso del control negativo de la secuencia de *anti-acpP* (**98**), hubo una serie de problemas durante el escalado, y si bien se llegó al compuesto al trabajar en pequeña escala, lo cual se pudo comprobar mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Figura 92), no pudo obtenerse dicho conjugado en una escala mayor por problemas de solubilidad del mismo, impidiendo su purificación por HPLC. La falta de disponibilidad de material de partida hizo imposible optimizar las condiciones de reacción para lograr obtener dicho conjugado en mayor escala.

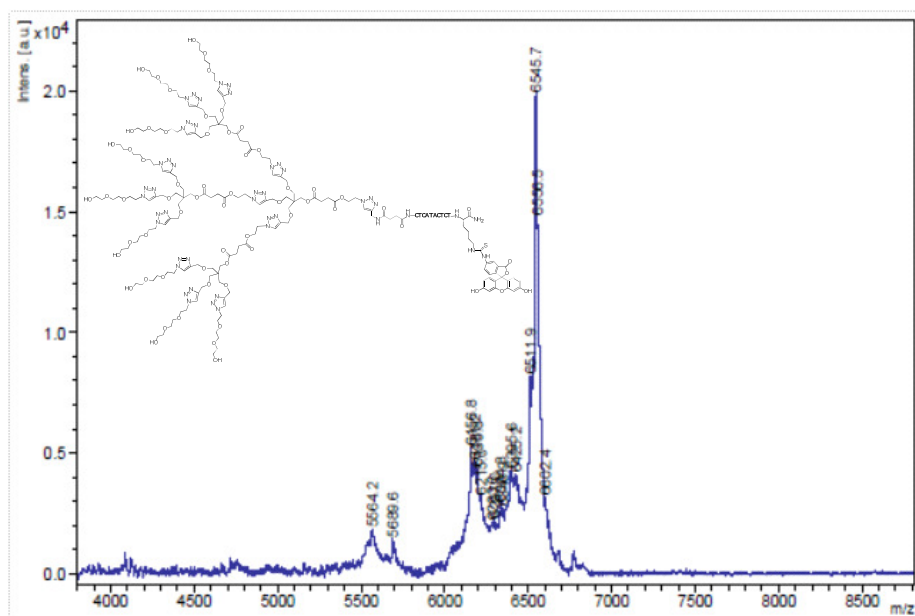


Figura 92. Espectro de masas MALDI-TOF del conjugado **98**. En él se puede observar el pico molecular (6545.7) y una fragmentación debida al impacto del láser que corresponde a la ruptura del enlace tiourea y consiguiente pérdida de la fluoresceína (6156.8).

5.4. Evaluación Biológica

Los conjugados PNA sintetizados fueron evaluados en el laboratorio del Profesor Giovanni Bertonì de la Università degli Studi di Milano. Se llevaron a cabo estudios de crecimiento bacteriano de *Escherichia Coli* (a través de absorbancia a 600 nm) en presencia de los glicoconjugados-PNA (**96** y **97**) y del control negativo (**95**). De esta manera, se calculó el porcentaje de inhibición en relación a la concentración de PNA. Para ello, se hicieron diferentes cultivos bacterianos en presencia de los glicoconjugados y del correspondiente control negativo.

La cepa de *E. coli* empleada fue K12MG16655 (F-lambda-*ilvG-rfb-50 rph-1*). Las bacterias se hicieron crecer a 37°C utilizando como medio de cultivo Luria-bertani (LB),²⁶⁸ aireando durante 16 horas. Tras ese tiempo, se diluyeron a OD₆₀₀ = 0.05 en LB 50% en microplatos de 96 pocillos. Posteriormente, se añadieron los conjugados y los controles, previamente disueltos en H₂O, a una concentración final de 100 µM y se incubó durante 22 horas a 37°C con agitación orbital. Se midió la absorbancia a 600 nm cada 15 minutos

²⁶⁸ E. S. Lennox, *Virology*, **1955**, *1*, 190-206.

empleando un lector automático de microplacas (Sunrise, Tecan) y se evaluaron las curvas de crecimiento bacteriano resultantes, llevando a cabo 6 réplicas de cada una (Figuras 93 y 94).

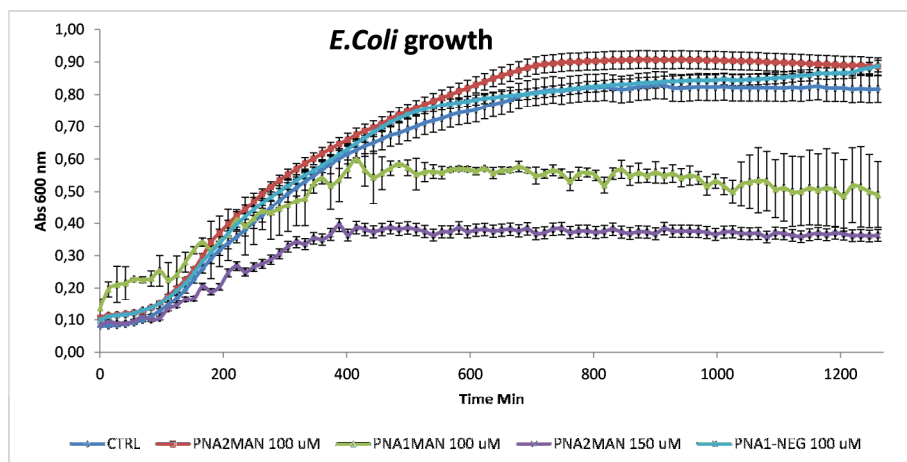


Figura 93. Curva de crecimiento bacteriano para los conjugados de PNA. PNA1MAN: *antifabI*-Man₉ (**96**); PNA2MAN: *antiacpP*-Man₉ (**97**); PNA1NEG: *antifabI*-Link₉ (**95**); CTRL: medio de cultivo LB50%.

En las curvas de crecimiento bacteriano se pudo observar que ambos glicoconjugados **96** (*antifabI*-Man₉) y **97** (*antiacpP*-Man₉) mostraron actividad inhibitoria del crecimiento (curvas verde y violeta) en comparación con el control (azul oscuro). El glicoconjugado **96** (*antifabI*-Man₉) es un inhibidor más potente, mostrando actividad a concentración de 100 μ M. Sin embargo, para el glicoconjugado **97** (*antiacpP*-Man₉), fue necesario aumentar la concentración a 150 μ M para observar dicho efecto inhibitorio.

El hecho más interesante es que la ausencia de manosa (curva azul claro, correspondiente a *antifabI*-Link₉ **95**) hace que el PNA pierda completamente su efectividad en la inhibición del crecimiento de *E.coli*, lo cual puede sugerir que dicho carbohidrato juega un papel importante en la internalización de la secuencia de PNA.

Por otro lado y según se esperaba, ninguno de los controles negativos probados (**20**, **94**, **95** y los PNAs **89** y **90** sin conjugar a los dendrones) mostró capacidad inhibitoria en el crecimiento de *E.coli*, tal y como se puede observar en la siguiente gráfica.

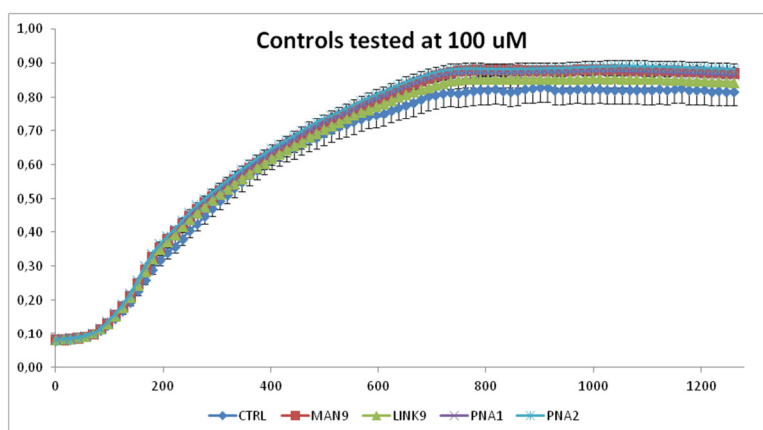


Figura 94. Curva de crecimiento bacteriano para los controles. PNA1: *antifabI* (89); PNA2: *antiacpP* (90); MAN9: Man₉N₃ (20); LINK9: Link₉N₃ (94); CTRL: medio de cultivo LB50%.

Finalmente, fue posible evaluar el índice de crecimiento de inhibición mediante análisis de la absorbancia a 600 nm (OD₆₀₀) tras 700 minutos de cultivo, tiempo en el que el control reacciona con la fase estacionaria (Figura 95).

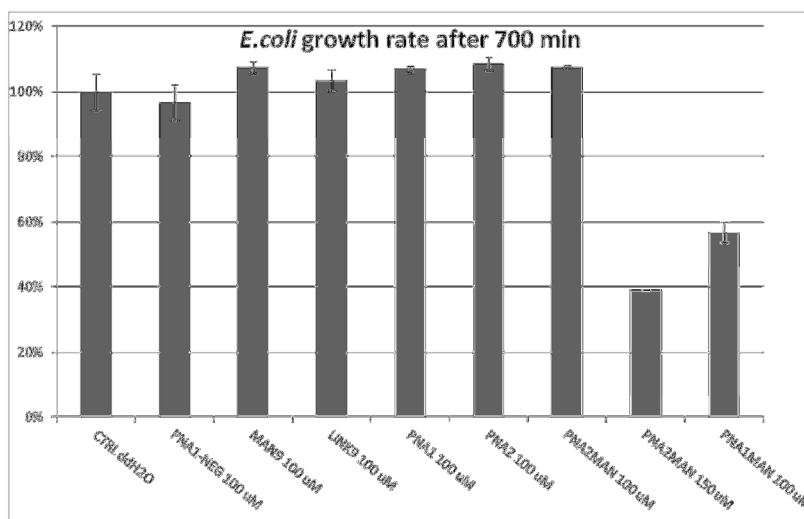


Figura 95. Índice de crecimiento de la inhibición tras 700 minutos de cultivo bacteriano.

Por tanto se puede decir que, aunque los glicoconjugados de PNA 96 y 97 demuestran una débil capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano (el grupo de Berttoni tiene evidencias de un PNA que inhibe el crecimiento de *P. aeruginosa* a concentraciones de 10 μ M), los carbohidratos juegan un papel

importante en la internalización de las secuencias de PNA, pudiendo abrir la puerta al desarrollo de antibióticos con propiedades mejoradas, así como al estudio de nuevas interacciones entre lectinas bacterianas y sus respectivos ligandos.

Una vez demostradas las propiedades antimicrobianas de estos compuestos, se pretende estudiar también el MIC (del inglés, *Minimum Inhibitory Concentration*) y el MIC50 (del inglés, *Minimum Inhibitory Concentration* requerida para inhibir el crecimiento bacteriano del 50% del organismo), para lo cual es necesario aumentar la concentración hasta dar lugar a una completa inhibición del crecimiento bacteriano. Otro ensayo a llevar a cabo, será el estudio del proceso de internalización de dichos compuestos mediante microscopía confocal, comprobando así, si ésta se da a través de interacciones específicas con los receptores de la pared bacteriana. Por tanto, es necesario preparar mayores cantidades de conjugados para ser capaces de completar el estudio y determinar qué papel juegan los carbohidratos en el aumento de la muerte bacteriana.



Capítulo

6

Conclusiones

6. Conclusiones

- ✓ La reacción de cicloadición 1,3-dipolar entre grupos alquino y azida ha demostrado ser muy eficiente y robusta en la construcción de sistemas multivalentes a través de una aproximación convergente empleando carbohidratos desprotegidos. De esta manera se ha podido acceder fácilmente a sistemas multivalentes monodispersos de manera eficaz, pudiéndose llegar a intermedios clave en escala de gramos. Además, se ha demostrado la versatilidad química de dicha reacción, permitiendo la conjugación entre sistemas complejos como glicodendrones, MAPs y PNAs.
- ✓ Se han desarrollado tres rutas complementarias y eficientes para la preparación de sistemas de glicodendropéptidos (GDPs) con hasta 9 copias de manosa y 16 de péptido basándonos en la *química click* con un control total de la valencia y de la estructura. Si bien, los ensayos biológicos obtenidos no han resultado ser tan satisfactorios como se esperaba, la versatilidad química de estas tres aproximaciones permite su uso en una elevada variedad de aplicaciones biológicas donde el tipo de carbohidrato y/o de péptido, así como sus respectivas valencias, pueden ser seleccionados según sea la diana terapéutica.
- ✓ Se ha demostrado que el dendrón tetravalente funcionalizado con el alérgeno Ole₁₀₉₋₁₃₀ del polen del olivo es reconocido por el sistema inmune, desencadenando un patrón de citocinas de tipo T_H2 (IgE e IgG1) típico de reacciones alérgicas, en ratones anafilácticos. Además, se ha demostrado que la presencia de un inmunomodulador de respuestas T_H1 (PTO-CpG) protege de la anafilaxis, evitando la aparición de la sintomatología típica de individuos atópicos. Actualmente se está preparando una estructura que combine covalentemente el péptido Ole₁₀₉₋₁₃₀ en forma multivalente y el PTO-CpG, para poder evaluar si esta construcción es más efectiva que los fragmentos que lo constituyen por separado.
- ✓ Por último, se han desarrollado sistemas híbridos de glicodendrón-PNA (*Peptide Nucleic Acid*) con posibles aplicaciones en el campo del desarrollo de antibióticos. Estudios preliminares han demostrado el potencial de estos conjugados, observándose la inhibición del crecimiento bacteriano en presencia de PNAs funcionalizados con glicodendrones. Por el contrario, los respectivos controles negativos no han mostrado dicha actividad, lo cual sugiere que los carbohidratos ejercen un posible papel en la internalización de estos compuestos. Este hecho abre la puerta no sólo al desarrollo de nuevos

antibióticos sino también al estudio de nuevas interacciones entre lectinas de la superficie de bacterias con sus respectivos ligandos.

Capítulo

7

Parte Experimental

7. Parte Experimental

7.1. Disolventes y Reactivos

Los reactivos y productos de partida se obtuvieron de las casas comerciales Sigma-Aldrich, SennChemicals y Dextra y fueron utilizados directamente sin purificación previa. El agua empleada como disolvente presenta una pureza miliQ (18.3 Ω). El diclorometano anhidro fue secado con un dispositivo de columna de alúmina PURESOLV (Scharlab).

Los demás disolventes anhidros fueron obtenidos dejándolos en contacto con tamiz molecular (4 Å) durante 48 horas.

La cromatografía en capa fina se llevó a cabo empleando cromatofolios de aluminio de gel de sílice tipo 600 F₂₅₄ (Merck). Para la detección de los productos se utilizó luz UV ($\lambda = 254$ nm), y/o los siguientes reveladores: H₂SO₄:EtOH (1:9, v:v), anisaldehído (450 mL etanol, 25 mL anisaldehído, 25 mL H₂SO₄ y 1 mL AcOH) y permanganato (1.5 g KMnO₄, 10 g de K₂CO₃, 1.25 mL de NaOH al 10% en 200 mL de H₂O). La cromatografía en columna se realizó sobre gel de sílice Merck tipo 60, de dos tamaños de partícula (0.2-0.063 mm y 0.040-0.015 mm). La composición del eluyente empleado se detalla en cada caso. La cromatografía de permeación sobre gel (exclusión por tamaño) se llevó a cabo utilizando Sephadex LH20 (Pharmacia, Suecia) y Sephadex G50 y G15 (Aldrich).

7.2. Técnicas y aparatos.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se registraron en los espectrómetros Bruker DRX-500, DRX-400 y DPX-300. Los espectros se realizaron empleando como disolvente deuterado el que se indica en cada caso y los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm, usando como referencia interna la señal residual del disolvente. Para la asignación de los compuestos más complejos se han utilizado experimentos bidimensionales de correlación protón-protón (COSY) y protón-carbono (HMQC) usando las secuencias de pulso estándar.

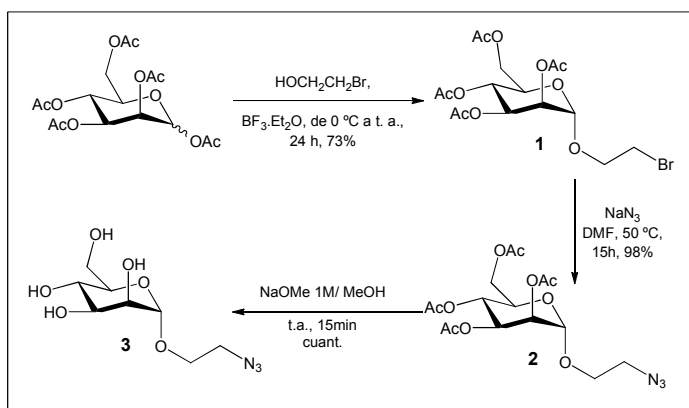
Los espectros de masas se llevaron a cabo en un espectrómetro Esquire 6000 Bruker Daltonics (EM-ESI), en un espectrómetro Bruker ULTRAFLEX III (MALDI-ToF), Micromass Autospec-Q (EMAR-FAB) y QTRAP (EMAR-IQ).

Los puntos de fusión se llevaron a cabo en un aparato MEL-TEMP[®] modelo 1002D y no están corregidos.

Los espectros de emisión UV se realizaron utilizando un espectrofluorímetro Edinburgh Analytical Instrument modelo FLS920P equipado con una lámpara de Xenon de 300 W. Las medidas del tiempo de vida de fluorescencia se realizaron con un aparato de Edinburgh Analytical Instruments modelo FL920 con una fuente de excitación LED PLS de la serie 500 (PicoQuant, $\lambda_{\text{max}} = 510$ nm, ancho de pulso ≈ 2 ns).

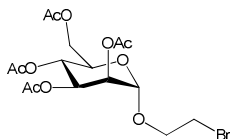
7.3. Procedimientos Sintéticos y Caracterización Estructural de los Compuestos Preparados

7.3.1. Síntesis de Glicodendrones



Esquema 43. Ruta sintética para la obtención de la manosa funcionalizada con un grupo azida **3**.

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetil- α -D-manopiranosido de 2-bromoetilo (**1**)¹²⁷

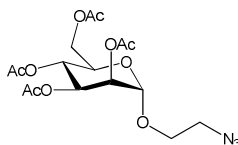


A una disolución de manosa peracetilada (5 g, 12.8 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (20 mL) se añade, enfriando en baño de hielo, 2-bromoetanol (1.13 mL, 16 mmol). A continuación, se adiciona lentamente bajo atmosfera de argón, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (8.25 mL, 64 mmol), tras lo cual, se deja que la reacción alcance temperatura ambiente. Transcurridas 24 horas, la mezcla de reacción se vierte sobre H_2O destilada (30 mL) en frío. La fase acuosa se extrae con CH_2Cl_2 (3 ×

30 mL) y la combinación de fases orgánicas se lava con H₂O destilada (3 × 10 mL), una disolución saturada de NaHCO₃ (3 × 10 mL) y, de nuevo, con H₂O destilada (3 × 10 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evapora a presión reducida. El crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla Hexano/AcOEt en gradiente desde 2:1 a 1:1. La manosa **1**, se obtiene como un sólido blanco (4.61 g, 73%).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 5.35 (dd, *J* = 3.2 Hz, 10.0 Hz, 1H, H₃), 5.31-5.25 (m, 2H, H₂, H₄), 4.87 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H₁), 4.27 (dd, *J* = 5.8 Hz, *J* = 12.9 Hz, 1H, H₆), 4.16-4.11 (m, 2H, H₅, H₆'), 4.02-3.84 (m, 2H, CH₂OH), 3.51 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH₂Br), 2.16 (s, 3H, CH₃), 2.10 (s, 3H, CH₃), 2.05 (s, 3H, CH₃), 1.99 (s, 3H, CH₃).

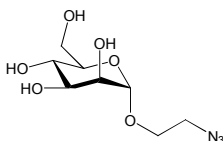
2,3,4,6-Tetra-*O*-acetil-α-D-manopiranosido de 2-azidoetilo (**2**)¹²⁷



Una suspensión del derivado de manosa **1** (3.2 g, 7.05 mmol) y NaN₃ (2.26 g, 35 mmol) en DMF (25 mL) se mantiene en agitación a 50°C durante 15 horas. Al cabo de ese tiempo, se evapora el disolvente a vacío y se añade AcOEt (30 mL). El precipitado blanco formado se filtra y la disolución se concentra a vacío, obteniéndose el compuesto **2** como un aceite amarillo (2.8 g, 98%).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 4.99 (dd, *J* = 3.3 Hz y 9.9 Hz, 1H, H₃), 4.96-4.89 (m, 2H, H₂, H₄), 4.53 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H₁), 3.93 (dd, *J* = 5.2 Hz y 12.2 Hz, 1H, H₆), 3.77 (dd, *J* = 2.4 Hz y 12.2 Hz, 1H, H₆'), 3.73-3.69 (m, 1H, H₅), 3.57-3.50 (m, 1H, H₇), 3.37-3.30 (m, 1H, CH₂O), 3.16-3.11 (m, 2H, CH₂N₃), 1.81 (s, 3H, CH₃), 1.75 (s, 3H, CH₃), 1.70 (s, 3H, CH₃), 1.64 (s, 3H, CH₃).

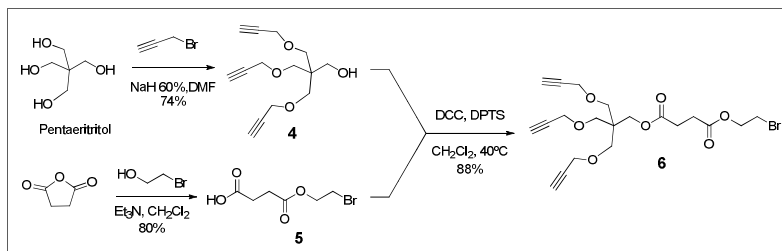
α-D-Manopiranosido de 2-azidoetilo (**3**)¹²⁷



Sobre una disolución del derivado de manosa **2** (2.8 g, 6.7 mmol) en MeOH anhidro (50 mL), se añade metóxido sódico hasta alcanzar pH 11. La mezcla de reacción se mantiene a temperatura ambiente y agitación magnética

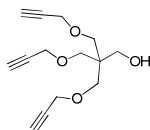
durante 15 minutos. Al cabo de este tiempo, se añade a la mezcla una pequeña cantidad de la resina IRA-120 H⁺ hasta alcanzar pH 5. La resina se filtra y el disolvente se elimina a presión reducida, obteniéndose el derivado de manosa **3** como un sólido blanco (1.67 g, 100%).

¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ = 4.81 (d, J = 1.5 Hz, 1H, H₁), 3.95-3.85 (m, 2H, H₂, H₃), 3.82 (sa, 1H, H₄), 3.74-3.57 (m, 5H, H₅, H₆, CH₂O), 3.41 (t, J = 4.9 Hz, 2H, CH₂N₃).



Esquema 44. Ruta sintética para la obtención del núcleo **6**.

Tris(2-propiniloximetil)hidroximetil metano (**4**)^{196,197}



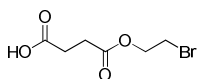
A una disolución de pentaeritritol (544 mg, 4 mmol) en DMF anhidra (100 mL) en atmósfera de argón y 0°C, se le añade una dispersión de NaH al 60 % en aceite mineral (720 mg, 18 mmol) en pequeñas porciones. Una vez finalizada la adición, se deja en agitación a 0°C durante una hora. Transcurrido ese tiempo, se añade gota a gota bromuro de propargilo al 80% en tolueno (1.7 mL, 15.6 mmol), se mantiene en agitación a 0°C durante 10 minutos y luego a temperatura ambiente toda la noche. Posteriormente, se añaden 100 mL de H₂O en baño de hielo y se extrae con tres fracciones de Et₂O (3 × 150 mL). La combinación de fases orgánicas se seca sobre Na₂SO₄ y el disolvente se elimina a presión reducida. El crudo resultante se purifica mediante cromatografía en gel de sílice, utilizando como eluyente Hexano/AcOEt (7:3). Se obtiene el compuesto **4** (740 mg, 74%) como un aceite amarillo.

R_f = 0.4 en Hexano/AcOEt (7:3).

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ = 4.14 (d, J = 2.4 Hz, 6H, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 3.70 (s, 2H, CH_2OH), 3.57 (s, 6H, CH_2O), 2.42 (t, J = 2.4 Hz, 3H, CH).

EM (ESI) calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$ (m/z): 250.3; encontrado: 273.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Ácido 4-(2-bromoetoxi)-4-oxobutanoico (**5**)²⁶⁹



A una disolución de anhídrido succínico (1g, 10 mmol) en CH_2Cl_2 seco (30 mL), se le añade, bajo atmósfera de argón, Et_3N (588 μL , 8.33 mmol) y 2-bromoetanol (1.4 mL, 10 mmol). La reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente toda la noche. Transcurrido dicho tiempo, el disolvente y el exceso de Et_3N se eliminan a presión reducida. El crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en gel de sílice utilizando como eluyente un gradiente de CH_2Cl_2 (100%) a $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5), obteniéndose 1.5 g (80%) de un sólido blanco.

R_f = 0.54 en $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5).

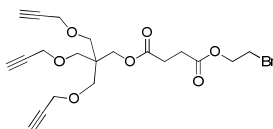
^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 4.40 (t, J = 6.1 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$), 3.49 (t, J = 6.1 Hz, 2H, CH_2Br), 2.68 (m, 4H, $\text{CH}_{2\text{succínico}}$).

^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3): δ = 178.1 (CO), 171.6 (CO), 64.1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$), 28.8 ($\text{CH}_{2\text{succínico}}$), 28.6 ($\text{CH}_{2\text{succínico}}$), 28.4 (CH_2Br).

EM (ESI) calculado para $\text{C}_6\text{H}_9\text{BrO}_4$ (m/z): 225,0; encontrado: 246.9 y 248.9 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

2-Bromoetil succinato (**6**)

3-(prop-2-iniloxi)-2,2-bis((prop-2-iniloxi)metil)propil



Sobre una disolución del alcohol **4** (50 mg, 0.2 mmol), el ácido 4-(2-bromoetoxi)-4-oxobutanoico **5** (105 mg, 0.47 mmol) y DPTS (29 mg, 0.1

²⁶⁹ J. M. Z. Gladych, E. P. Taylor, *J. Chem. Soc.*, **1962**, 1481-1487.

mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (7 mL), se añade otra disolución de DCC (103 mg, 0.5 mmol) en el mismo disolvente (3 mL). La mezcla de reacción se mantiene en agitación a 40°C bajo atmósfera de argón durante toda la noche. Transcurrido ese tiempo, se filtra la diciclohexilurea y el crudo de reacción se purifica mediante cromatografía líquida en gel de sílice, eluyendo con Hexano/AcOEt (8:2) para dar el compuesto **6** como un aceite incoloro (80 mg, 88%).

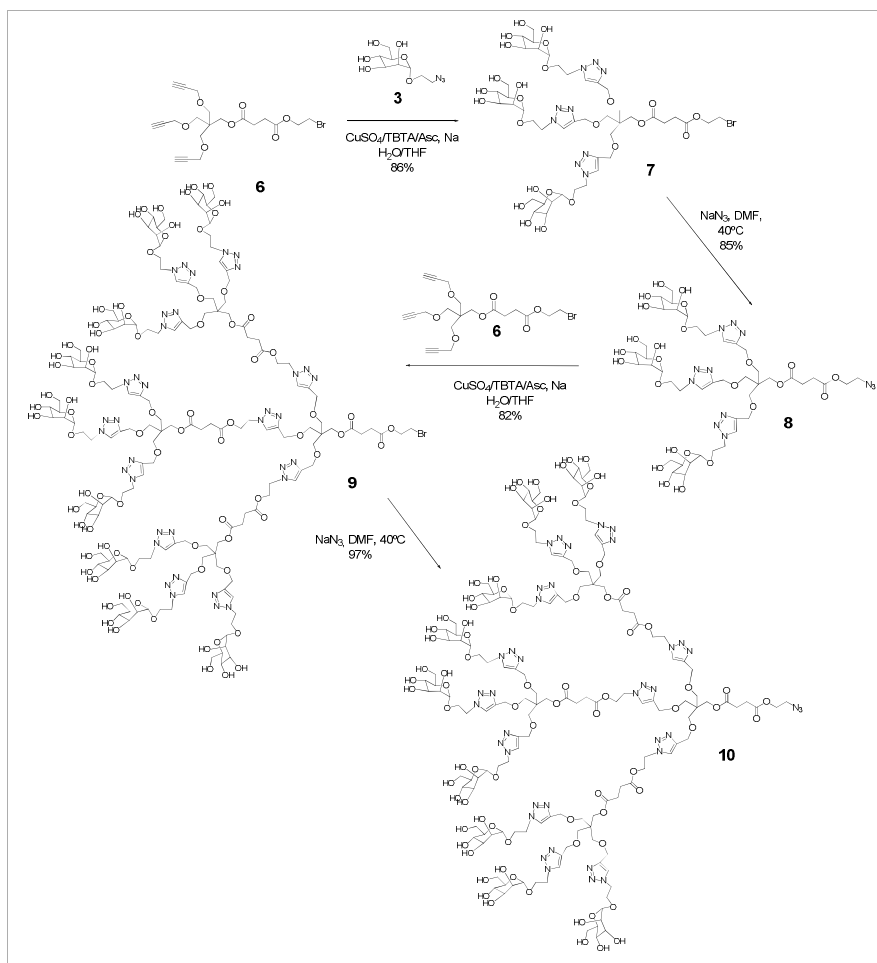
$R_f = 0.47$ en Hexano/AcOEt (7:3).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 4.41$ (t, $J = 6.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$), 4.16 (s, 2H, CH_2O), 4.12 (d, $J = 2.4$ Hz, 6H, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 3.51-3.48 (m, 8H, CH_2O , CH_2Br), 2.67-2.65 (m, 4H, CH_2 succínico), 2.42 (t, $J = 2.4$, 3H, CH).

^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3): $\delta = 171.8$ (CO), 171.7 (CO), 79.8 (CCH), 74.3 (CH), 68.7 ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 64.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$), 63.8 (CH_2O), 58.7 (CH_2O), 44.1 (C), 29.1 (CH_2 succínico), 29.0 (CH_2 succínico), 28.57 (CH_2Br).

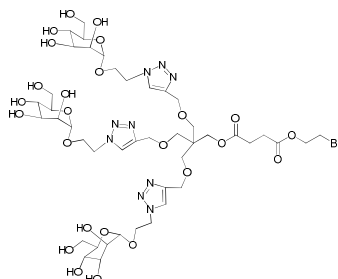
EM (ESI), calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{BrO}_7$ (m/z): 456.1; encontrado: 479.1, 481.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

EMAR (ESI), calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{BrO}_7$ (m/z): 456.0784; encontrado: 479.2456 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.



Esquema 45. Ruta sintética para la obtención de los glicodendrones de 3 (**8**) y 9 (**10**) manosas.

Glicodendrón 7



A una disolución del compuesto **6** (53 mg, 120 μmol) y del α -D-manopiranosido de 2-azidoetilo **3** (95 mg, 38 μmol) en $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ (1:1) (0.55 mL), se añade otra de TBTA (12.3 mg, 23 μmol) y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2.9 mg, 12

μmol) en el mismo disolvente (0.45 mL). Por último, se añade el ascorbato sódico (9.2 mg, 46 μmol) disuelto en H₂O (0.1 mL). La mezcla de reacción se deja en agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. Transcurrido ese tiempo, se adiciona la resina Quadrasil®MP y se agita 5 minutos. El crudo se filtra y se purifica mediante Sephadex LH-20 (MeOH, 100%) para dar el compuesto **7** como un sólido blanco (120 mg, 86%).

$R_f = 0.27$ en $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (8:2).

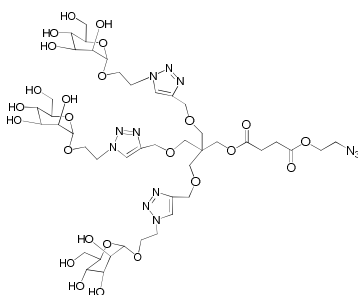
¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ = 8.01 (s, 3H, H_{triazol}), 4.74 (s, 3H, H₁), 4.64 (m, 6H, H₈), 4.54 (s, 6H, H₉), 4.38 (t, J= 5.8 Hz, 2H, CH₂CH₂Br), 4.14-4.09 (m, 5H, H₇, H₁₁), 3.89-3.88 (m, 3H, H₇), 3.79-3.76 (m, 6H, H₂, H₆), 3.71-3.53 (m, 11H, H₃, H₅, H₆, CH₂Br), 3.48 (s, 6H, H₁₀), 3.27-3.25 (m, 3H, H₄), 2.62-2.58 (m, 4H, CH_{2succinico}).

¹³C RMN (101 MHz, CD₃OD): δ = 173.8 (CO), 173.7 (CO), 146.6 (C_{triazol}), 125.9 (CH_{triazol}), 101.6 (CH₁), 74.9 (CH₄), 72.5 (CH₃), 71.9 (CH₂), 69.8 (CH₁₀), 68.3 (CH₅), 66.7 (CH₇H₇), 65.5 (CH₉ y CH₂CH₂Br), 65.3 (CH₁₁), 62.8 (CH₆H₆), 51.3 (CH₈), 45.6 (C_{pentaeritritol}), 29.9 (CH₂Br), 29.8 (CH₂succínico), 29.7 (CH₂succínico).

EM(ESI), calculado para $C_{44}H_{70}BrN_9O_{25}$ (m/z): 1204.96; encontrado: 1226.6, 1228.6 $[M+Na]^+$.

EMAR (ESI), calculado para $C_{44}H_{70}BrN_9O_{25}$ (m/z): 1203.3660; encontrado: 1226.3523 $[M+Na]^+$.

Glicodendrón 8



Una suspensión del bromo derivado **7** (120 mg, 0.1 mmol) y NaN_3 (52 mg, 0.8 mmol) en DMF (2.4 mL) se mantiene en agitación a 40°C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, se filtra el exceso de NaN_3 y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purifica mediante

Sephadex LH20 (MeOH, 100%) dando el glicodendrón **8** como un sólido blanco (99 mg, 85%).

$R_f = 0.27$ en $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (8:2).

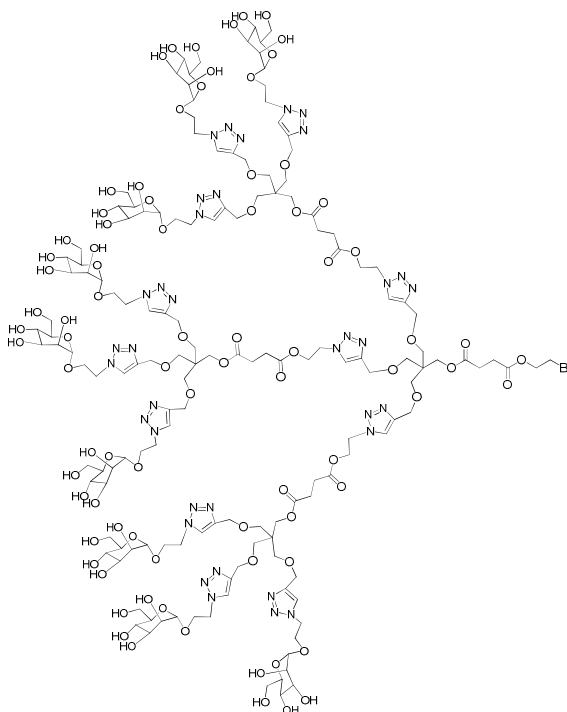
^1H RMN (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 7.94$ (s, 3H, H_{triazol}), 4.67 (s, 3H, H_1), 4.57-4.56 (m, 6H, H_8), 4.47 (s, 6H, H_9), 4.16 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 4.06-4.01 (m, 5H, H_7 , H_{11}), 3.82-3.79 (m, 3H, H_7), 3.76-3.69 (m, 6H, H_2 , H_6), 3.61-3.55 (m, 9H, H_3 , H_5 , H_6), 3.43 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H, CH_2N_3), 3.39 (s, 6H, H_{10}), 3.17 (t, 3H, H_4), 2.55-2.51 (m, 4H, $\text{CH}_{2\text{succínico}}$).

^{13}C RMN (101 MHz, CD_3OD): $\delta = 173.8$ (CO), 146.0 ($\text{C}_{\text{triazol}}$), 125.8 ($\text{CH}_{\text{triazol}}$), 101.6 (CH_1), 74.9 (CH_4), 72.5 (CH_3), 71.9 (CH_2), 69.8 (CH_{10}), 68.3 (CH_5), 66.8 (CH_7H_7), 65.32 (CH_9 y $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$), 64.60 (CH_{11}), 62.8 (CH_6H_6), 51.3 (CH_8), 50.9 (CH_2N_3), 45.6 ($\text{C}_{\text{pentaeritritol}}$), 29.9 ($\text{CH}_{2\text{succínico}}$), 29.8 ($\text{CH}_{2\text{succínico}}$).

EM (ESI) calculado para $\text{C}_{44}\text{H}_{70}\text{N}_{12}\text{O}_{25}$ (m/z): 1167.09; encontrado: 1189.40 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

EMAR (ESI) calculado para $\text{C}_{44}\text{H}_{70}\text{N}_{12}\text{O}_{25}$ (m/z): 1166.4575; encontrado: 1189.4519 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Glicodendrón 9.



A una disolución del bromoderivado **6** (4.4 mg, 9.5 μmol) y del glicodendrón **8** (40 mg, 34 μmol) en $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ (1:1) (0.4 mL), se añade otra de TBTA (2 mg, 3.8 μmol) y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (3.8 mg, 15 μmol) en el mismo disolvente (0.4 mL). A continuación, se añade el ascorbato sódico (1.5 mg, 7.6 μmol) en H_2O (0.1 mL) y la mezcla de reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 3 h. Al cabo de este tiempo, se añade la resina Quadrasil[®]MP agitando 5 minutos. El crudo se filtra y se purifica mediante cromatografía por exclusión de tamaño (Sephadex G-25, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 9:1). El compuesto **9** se obtiene como un sólido blanco (31 mg, 82%).

$R_f = 0.18$ en $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (7:3).

^1H RMN (400 MHz, $D_2\text{O}$): $\delta = 8.05\text{--}8.02$ (m, 12H, $\text{H}_{\text{triazol}}$), 4.79 (s, 9H, H_1), 4.71 (s, 6H, H_{13}), 4.65 (s, 18H, H_8), 4.55 (s, 24H, H_9), 4.49 (s, 6H, H_{12}), 4.35 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$), 4.10–4.09 (m, 9H, H_7), 3.95–3.91 (m, 17H, H_7 , H_{11}), 3.87 (s, 9H, H_2), 3.76–3.61 (m, 38H, H_6 , H_6' , H_3 , H_5 , CH_2Br), 3.41 (s, 24H, H_{10}), 3.10 (m, 9H, H_4), 2.59–2.53 (m, 16H, $\text{CH}_{2\text{succínico}}$).

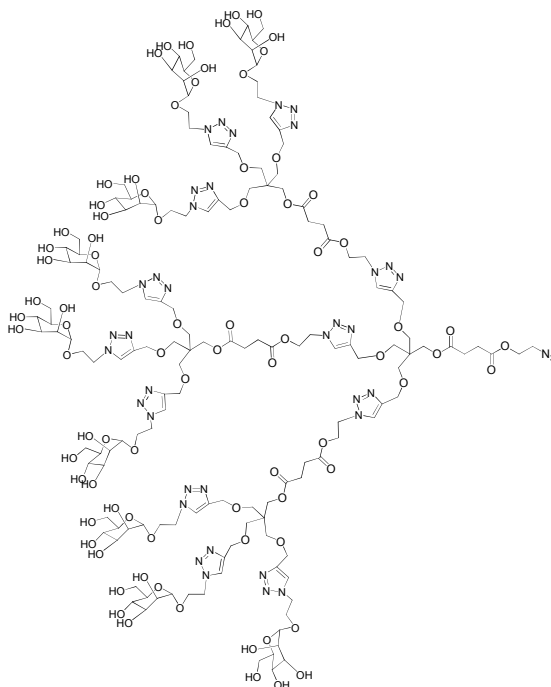
^{13}C RMN (101 MHz, $D_2\text{O}$): $\delta = 178.4$ (CO), 173.7 (CO), 173.6 (CO), 144.2 ($\text{C}_{\text{triazol}}$), 125.4 ($\text{CH}_{\text{triazol}}$), 99.6 (CH_1), 72.8 (CH_4), 70.5 (CH_3), 69.9 (CH_2), 67.9 (CH_{10}), 66.4 (CH_5), 65.5 ($\text{CH}_7\text{H}_7'$), 63.6 (CH_9), 63.3, 63.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$, CH_{12}).

63.1 (CH_{11}), 60.7 (CH_6H_6), 50.0 (CH_8), 49.1 (CH_{13}), 44.0 (C), 28.7 ($\text{CH}_{2\text{succínico}}$), 29.9 (CH_2Br), 28.6 ($\text{CH}_{2\text{succínico}}$).

EM (ESI), calculado para $\text{C}_{152}\text{H}_{235}\text{BrN}_{36}\text{O}_{82}$ (m/z): 3958.6; encontrado: 3958.6 $[\text{M}]^+$.

EMAR (ESI), calculado para $\text{C}_{152}\text{H}_{235}\text{BrN}_{36}\text{O}_{82}$ (m/z): 3958.5883; encontrado: 3958.6135 $[\text{M}]^+$.

Glicodendrón 10



Una suspensión del glicodendrón **9** (20 mg, 5 μmol) y NaN_3 (2.6 mg, 40 μmol) en DMF (0.31 mL) se mantiene en agitación a 40°C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, se filtra el exceso de NaN_3 , se evapora el disolvente y se purifica mediante Sephadex G-25 ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$, 9:1), dando el producto **10** como un sólido blanco (19 mg, 97%).

$R_f = 0.18$ en $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (7:3).

^1H RMN (500 MHz, D_2O): δ = 8.04 (s, 9H, $\text{H}_{\text{triazol}}$), 8.02 (s, 3H, $\text{H}_{\text{triazol}}$), 4.70 (s, 6H, H_{13}), 4.65-4.54 (m, 18H, H_8), 4.56 (m, 24H, H_9), 4.48 (s, 6H, H_{12}), 4.20 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 4.09 (m, 9H, H_7), 3.99-3.93 (m, 17H, H_{11} , H_7), 3.86

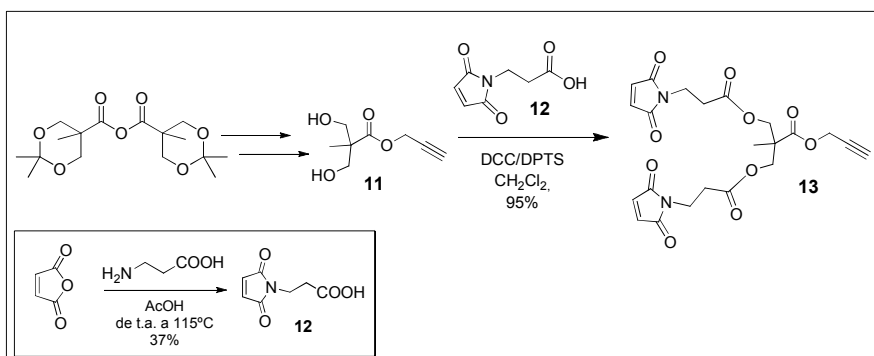
(s, 9H, H₂), 3.75-3.59 (m, 36H, H₃, H₅, H₆, H_{6'}), 3.50 (m, 2H, CH₂N₃), 3.41 (s, 24H, H₁₀), 3.10-3.09 (m, 9H, H₄), 2.59-2.52 (m, 16H, CH_{2succínico}).

¹³C RMN (126 MHz, D₂O): δ = 173.6 (CO), 144.2 (C_{triazol}), 125.4 (CH_{triazol}), 99.6 (CH₁), 72.8 (CH₄), 70.5 (CH₃), 69.9 (CH₂), 67.9 (CH₁₀), 66.4 (CH₅), 65.5 (CH_{7H7'}), 63.6 (CH₉, CH₁₁, CH₁₂), 63.1 (CH₂CH₂N₃), 60.7 (CH₆H_{6'}), 50.0 (CH₈), 49.4 (CH₁₃), 49.1 (CH₂N₃), 43.9 (C), 28.7 (CH_{2succínico}), 28.6 (CH_{2succínico}).

EMAR (ESI), calculado para C₁₅₂H₂₃₅N₃₉O₈₂: 3920.7044; encontrado: 3920.5720 [M]⁺.

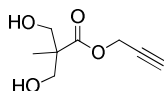
7.3.2. Síntesis de Dendrones Maleimida (D_p-Alq)

7.3.2.1. Síntesis del Dendróon Divalente **13** (D₂-Alq)



Esquema 46. Síntesis del dendrón de dos maleimidias **13**.

2,2-Bis(hidroximetil)propionato de propargilo (**11**)



Una disolución de anhídrido isopropiliden-2,2-bis(metoxi)propiónico (bis-MPA)²⁰⁰ (7.4 g, 22.4 mmol) en CH₂Cl₂ (70 mL) se adiciona lentamente a una del alcohol propargílico (1 mL, 17.0 mmol) y DMAP (0.325 g, 2.6 mmol) en piridina (25 mL). Después de agitar a temperatura ambiente durante 15 h, se añade H₂O (1 mL) y se agita vigorosamente. La mezcla se diluye con CH₂Cl₂ (200 mL) y se lava con NaHSO₄ al 10% (3 × 40 mL), Na₂CO₃ al 10% (3 × 40

mL) y una disolución de NaCl saturada (20 mL). El crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en gel de sílice, eluyendo con Hexano:AcOEt (85:15) para dar el intermedio protegido como un aceite incoloro (3.3 g, 90%). Una disolución de este producto (1.00 g, 4.71 mmol) en MeOH (20 mL) se agita en presencia de la resina DOWEX 50W-X8 (1.5 g) hasta que se observe una completa desaparición del material de partida. Entonces, la resina se filtra y el filtrado se evapora a vacío para dar el compuesto **11** como un aceite incoloro (0.78 g, 97%).¹⁹⁹

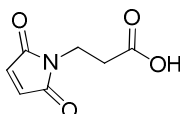
$R_f = 0.18$ en Hexano/AcOEt (1:1).

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 4.67$ (s, 2H, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 3.78 (d, $J=11.1$ Hz, 2H, CCH_2OH), 3.63 (d, $J=11.1$ Hz, 2H, CCH_2OH), 3.54 (sa, 2H, CCH_2OH), 2.50 (t, $J=2.5$ Hz, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 1.06 (s, 3H, CH_3CCOO).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 174.7$ (COO), 75.2 (C), 77.3 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 65.87 (CCH_2O), 52.2 ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$), 49.4 (CCH_2O), 18.9 (CH_3).

EM (ESI), calculado para $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_4$ (m/z): 173.1; encontrado: 173.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Ácido 3-maleimido propiónico (**12**)²⁰¹



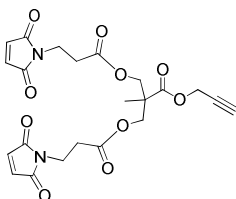
Sobre una disolución de anhídrido maleico (5 g, 56.12 mmol) en ácido acético (70 mL), se añade gota a gota otra disolución de β -alanina (5.50 g, 56.12 mmol) en el mismo disolvente (25 mL). La mezcla se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. Transcurrido ese tiempo, se añaden 50 mL más de ácido acético y se calienta a 115°C toda la noche. Posteriormente, se elimina el disolvente a presión reducida y se purifica mediante cromatografía en gel de sílice, utilizando como eluyente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (9:1). El compuesto **12** se obtiene como un sólido blanco (3.5 g, 37%).

Pf: $110\text{--}112^\circ\text{C}$; $\text{Pf}_{\text{lit}}^{201}$: $105\text{--}107^\circ\text{C}$.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 6.72$ (s, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$), 3.81 (t, $J=7.3$ Hz, 2H, CH_2N), 2.86 (t, $J=7.3$ Hz, 2H, CH_2COOH).

^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ = 176.7 (COOH), 170.4 (CO), 134.4 (CH=CH), 33.5 (CH_2N), 32.6 (CH_2COOH).

Dendrón 13 ($\text{D}_2\text{-Alq}$)



El compuesto **11** (100 mg, 0.58 mmol), el ácido 3-maleimidopropionico (**12**) (295 mg, 1.74 mmol) y DPTS (170 mg, 0.58 mmol) se disuelven en CH_2Cl_2 (7 mL) bajo atmósfera de argón. Posteriormente, se añade una disolución de DCC (360 mg, 1.74 mmol) en CH_2Cl_2 (3 mL) y la mezcla se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. Transcurrido ese tiempo, se filtra la dicitclohexilurea lavando con un pequeño volumen de CH_2Cl_2 y el filtrado se evapora a vacío. El crudo se purifica mediante cromatografía en gel de sílice utilizando como eluyente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (98:2), dando el dendrón **13** como un aceite incoloro (261 g, 95%).

R_f = 0.5 en $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5).

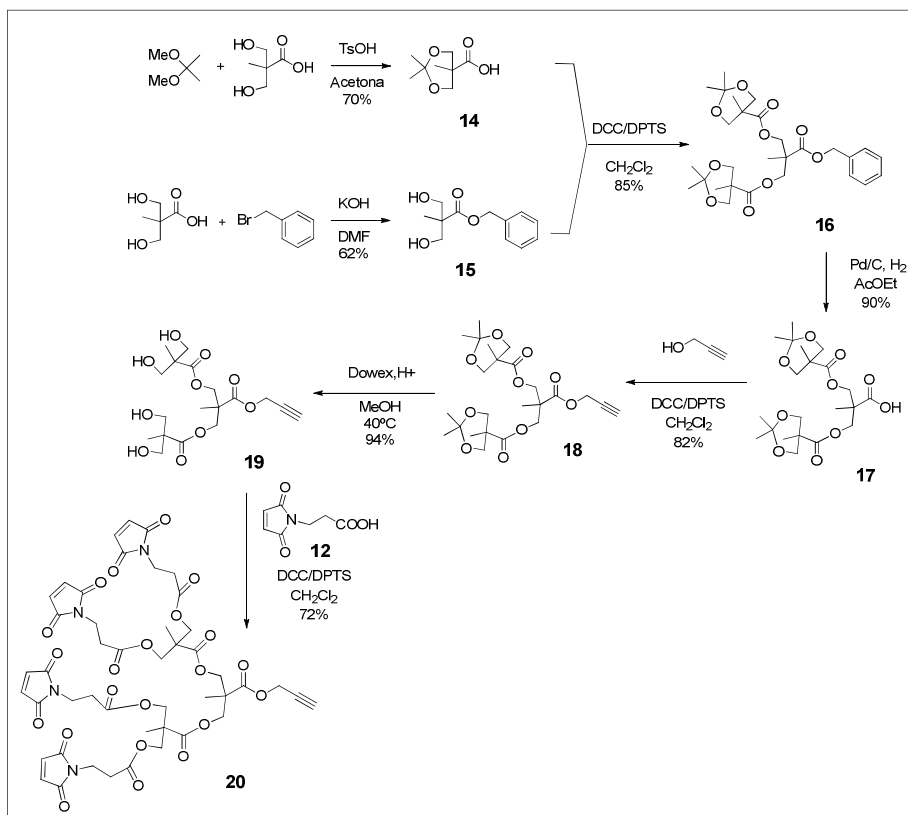
^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 6.71 (s, 4H, $\text{CH}_2=\text{CH}_2$), 4.72 (d, J = 2.4 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 4.23 (d, J = 11.1 Hz, 4H, CCH_2O), 3.81 (t, J = 7.1 Hz, 4H, CH_2N), 2.65 (t, J = 7.1 Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.54 (t, J = 2.4, 2.40 Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 1.26 (s, 3H, CH_3).

^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3): δ = 171.6 (COO), 170.2 (CON), 170.1 (COO), 134.1 (CH=CH), 77.1 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 75.3 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 65.4 (CCH_2O), 52.5 ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 46.0 (CCH_2O), 33.4 (CH_2N), 32.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 17.6 (CH_3).

EM (ESI), calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_{10}$ (m/z): 474.128; encontrado: 475.075 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

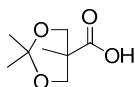
EMAR (ESI), calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_{10}$ (m/z): 474.1274; encontrado: 475.0747 $[\text{M}]^+$, 476.1173 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7.3.2.2. Síntesis del Dendrón Tetraivalente **20** (D_4 -Alq)



Esquema 47. Ruta sintética para la obtención del dendrón de 4 maleimidias **20**.

Ácido isopropiliden-2,2-bis(hidroximetil) propiónico (**14**)²⁰³

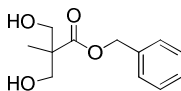


El bis-MPA (50 g, 373 mmol), el 2,2-dimetoxipropano (69 mL, 559 mmol) y el ácido *p*-toluensulfónico (3.54 g, 18.6 mmol) se disuelven en acetona (250 mL). La mezcla de reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas. Después, el catalizador se neutraliza por adición de una disolución de NH_3/EtOH (1:1) (5 mL) y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo resultante se disuelve en CH_2Cl_2 (800 mL) y se extrae con H_2O (2×60 mL). La fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 y el disolvente se evapora a vacío para dar el compuesto **14** (45.4 g, 70%) como cristales blancos.

Pf: 121-122°C; Pf_{lit}^{203} : 122-123°C.

1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 4.19 (d, J = 12.0 Hz, 2H, CH_2O), 3.75-3.64 (m, 2H, CH_2O), 1.44 (s, 3H, CH_3), 1.41 (s, 3H, CH_3), 1.21 (s, 3H, CH_3).

2,2 Bis(hidroximetil) propionato de bencilo (**15**)²⁰³



A una disolución de bis-MPA (9 g, 67.11 mmol) en DMF anhidra (50 mL) se le añade KOH (4.30 g, 76.79 mmol) y se calienta a 100°C, agitando durante una hora. Transcurrido este tiempo, se adiciona bromuro de bencilo (13.80 g, 80.71 mmol) y se agita durante 15 h a dicha temperatura. Después, se elimina el disolvente a alto vacío. El residuo se disuelve en CH_2Cl_2 (200 mL) y se extrae con H_2O (2 \times 50 mL). El crudo de reacción se cristaliza con Hexano/ CH_2Cl_2 , obteniendo el compuesto **15** (9.3 g, 62%) como cristales blancos.

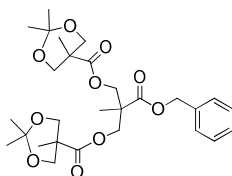
Pf: 74-75°C; Pf_{lit}^{203} : 75°C.

1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.36 (s, 5H, ArH), 5.21 (s, 2H, CH_2Ar), 3.94 (d, J = 11.2 Hz, 2H, CH_2OH), 3.73 (d, J = 11.2 Hz, 2H, CH_2OH), 2.88 (s, 2H, OH), 1.08 (s, 3H, CH_3).

^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 175.7 (CO), 128.6 (C_{Ar}), 128.3 (C_{Ar}), 127.8 (C_{Ar}), 67.5 (CH_2O), 66.6 (CH_2O), 49.4 ($C_{bis-MPA}$), 17.2 (CH_3).

EM (ESI) calculado para $C_{12}H_{16}O_4$ (m/z): 224.3; encontrado: 247.3 $[M+Na]^+$.

Tetrol protegido **16**²⁰³



A una disolución de 2,2 bis(hidroximetil)propionato de bencilo (**15**) (2.46 g, 11 mmol), de ácido isopropiliden-2,2-bis(hidroximetil)propiónico (**14**) (4.00 g, 23 mmol) y DPTS (1.29 g, 4.4 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (30 mL), se le añade otra de DCC (5.67 g, 27.5 mmol) en el mismo disolvente (10 mL). La

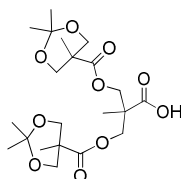
reacción se mantiene en agitación bajo atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 15 horas. Una vez que se completa la reacción, el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se redissuelve en AcOEt y la dicitclohexilurea se filtra, lavando con una pequeña porción de dicho disolvente. El crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en gel de sílice, usando como eluyente Hexano/AcOEt (3:2). El derivado **16** se obtiene como un aceite incoloro (4.99 g, 85%).¹⁹⁹

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.34-7.29 (m, 5H, ArH), 5.14 (s, 2H, CH₂Ar), 4.34-4.12 (m, 4H, CH₂C), 4.09 (d, J = 7.4 Hz, 4H, CH₂O), 3.56 (d, J = 7.4 Hz, 4H, CH₂O), 1.40 (s, 6H, CH₃), 1.34 (s, 6H, CH₃), 1.30 (s, 3H, CH₃), 1.09 (s, 6H, CH₃).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ = 173.6 (CO), 172.4 (CO), 135.5 (CAr), 128.6 (CAr), 128.5 (CAr), 128.3 (CAr), 98.1 (Cⁱpr), 67.0 (CH₂O), 66.0 (CH₂O), 65.9 (CH₂O), 65.4 (CH₂O), 46.9 (CH₂Ar), 42.0 (C_{bis}-MPA), 25.0 (CH₃ⁱpr), 22.3 (CH₃ⁱpr), 18.5 (CH₃), 17.7 (CH₃).

EM (ESI) calculado para C₂₈H₄₀O₁₀ (m/z): 536.6; encontrado: 559.6 [M+Na]⁺.

Ácido **17**²⁰³



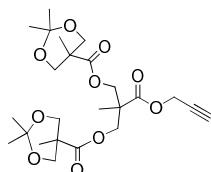
A una disolución del compuesto **16** (612 mg, 1.14 mmol) en AcOEt (5 mL), se le añade Pd(C) catalítico, se genera atmósfera de H₂ (4 Bar) y se mantiene en agitación toda la noche. Transcurrido este tiempo, la disolución se filtra sobre celita y se elimina el disolvente a presión reducida, obteniéndose el ácido **17** como un aceite viscoso incoloro (484 mg, 90%).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 6.57 (sa, 1H, COOH), 4.40-4.27 (m, 4H, CH₂C), 4.16 (d, J = 7.4 Hz, 4H, CH₂O), 3.63 (d, J = 7.4 Hz, 4H, CH₂O), 1.41 (s, 6H, CH₃), 1.36 (s, 6H, CH₃), 1.30 (s, 3H, CH₃), 1.14 (s, 6H, CH₃).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 177.3 (CO), 173.5 (CO), 98.3 (CⁱPr), 65.9 (CH₂O), 65.9 (CH₂O), 65.1 (CH₂O), 46.5 (C_{bis}-MPA), 42.0 (C_{bis}-MPA), 24.9 (CH₃ⁱpr), 22.3 (CH₃ⁱpr), 18.5(CH₃), 17.7 (CH₃).

EM (ESI) calculado para $C_{21}H_{34}O_{10}$ (m/z): 446.5; encontrado: 469.5 $[M+Na]^+$.

Derivado 18



En un matraz se introduce el ácido **17** (821 mg, 1.9 mmol), el alcohol propargílico (0.3 mL, 5.7 mmol) y DPTS (558 mg, 1.9 mmol) y se disuelven en CH_2Cl_2 seco (10 mL). A continuación, se añade una disolución de DCC (1.18 g, 5.7 mmol) en CH_2Cl_2 (5 mL) y la reacción se mantiene en agitación a $40^\circ C$ y atmósfera de argón durante 24 horas. La dicitclohexilurea se filtra sobre celita fina lavando con AcOEt. La purificación se lleva a cabo por cromatografía en gel de sílice utilizando como eluyente Hexano/AcOEt (4:1), obteniéndose el derivado **18** como un sólido blanco (683 g, 82%).¹⁹⁹

$R_f = 0.60$ en Hexano/AcOEt (2:1).

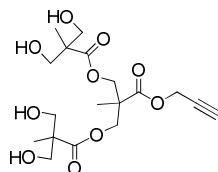
1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 4.72$ (d, $J = 2.5$ Hz, 2H, $CH_2C\equiv CH$), 4.33 (s, 4H, CCH_2O), 4.16 (d, $J = 11.1$ Hz, 4H, CCH_2OCCH_3), 3.62 (d, $J = 11.1$ Hz, 4H, CCH_2OCCH_3), 2.47 (t, 1H, $J = 2.5$ Hz), 1.42 (s, 6H, CCH_3), 1.36 (s, 6H, CCH_3), 1.32 (s, 3H, CCH_3) 1.16 (s, 6H, CH_3CCOO).

^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 173.5$, 171.8 (COO), 101.4 (C^iPr), 77.2, 75.3 ($C\equiv CH$), 66.0, 65.3 (CCH_2O), 52.7 ($CH_2C\equiv C$), 46.8, 42.0 (CCH_2O), 25.0, 22.2, 18.5, 17.6 (CH_3).

EM(ESI) calculado para $C_{24}H_{36}O_{10}$ (m/z): 484.5; encontrado: 485.3 $[M+H]^+$.

EMAR (FAB), calculado para $C_{24}H_{36}O_{10}$ (m/z): 484.5366; encontrado: 507.2211 $[M+Na]^+$.

Tetrol 19



Sobre una disolución del derivado **18** (641 mg, 1.32 mmol) en MeOH (12 mL) se añade Dowex activada con HCl al 10%. La reacción se mantiene en agitación durante toda la noche a 40°C. Una vez finalizado dicho tiempo, se filtra la resina y el disolvente se elimina a presión reducida, obteniéndose el compuesto **19** como un sólido blanco (500 mg, 94%).²⁷⁰

$R_f = 0.18$ en Hexano/AcOEt (1:1).

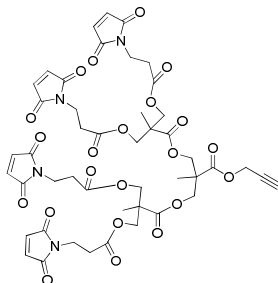
¹H RMN (300 MHz, *CDCl*₃): δ = 4.72 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H, CH₂C≡CH), 4.33 (s, 4H, CCH₂O), 3.71-3.59 (m, 8H, CCH₂OCCH₃), 2.47 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H, CH₂C≡CH), 1.42 (s, 6H, CH₃); 1.36 (s, 6H, CH₃), 1.32 (s, 3H, CH₃) 1.16 (s, CH₃CCOO, 6H).

¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ = 175.1, 172.2 (COO), 75.5 (CH), 67.9 (CH₂OH), 64.71 (CH₂O), 52.8 (CH₂C≡CH), 49.7 (C), 46.4 (C), 18.0 (CH₃), 17.1 (CH₃).

EM (ESI), calculado para $C_{18}H_{28}O_{10}$ (m/z): 404.4; encontrado: 405.1 $[M+H]^+$.

EMAR (FAB), calculado para $C_{18}H_{28}O_{10}$ (m/z): 404.4089; encontrado: 426.1581 $[M+Na]^+$.

Dendrón 20 (D₄-Alq)



²⁷⁰ H. Altin, I. Kosif, R. Sanyal, *Macromolecules*, **2010**, *43*, 3801-3808.

En un matraz se añade el tetrol **19** (100 mg, 0.25 mmol), el ácido 3-maleimidopropiónico (**12**) (250 mg, 1.48 mmol) y DPTS (145 mg, 0.4 mmol) y se disuelven en CH_2Cl_2 seco (3 mL). A continuación, se añade una disolución de DCC (305 mg, 1.48 mmol) en el mismo disolvente (2 mL). Se mantiene en agitación a temperatura ambiente y atmósfera de argón durante 15 horas. Después, la urea de la DCC se filtra sobre celita fina lavando con AcOEt y el crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en gel de sílice utilizando como eluyente $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (98:2). El derivado **20** se obtiene como un aceite incoloro (195 mg, 72%).

$R_f = 0.28$ en $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (2:1).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 6.72$ (s, 8H, $\text{CH}=\text{CH}$), 4.73 (d, $J = 2.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 4.21 (m, 12H, CCH_2O), 3.81 (t, $J = 7.0$ Hz, 8H, CH_2N), 2.66 (t, $J = 7.0$ Hz, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.54 (t, $J = 2.5$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 1.27 (s, 3H, CH_3), 1.22 (s, 6H, CH_3).

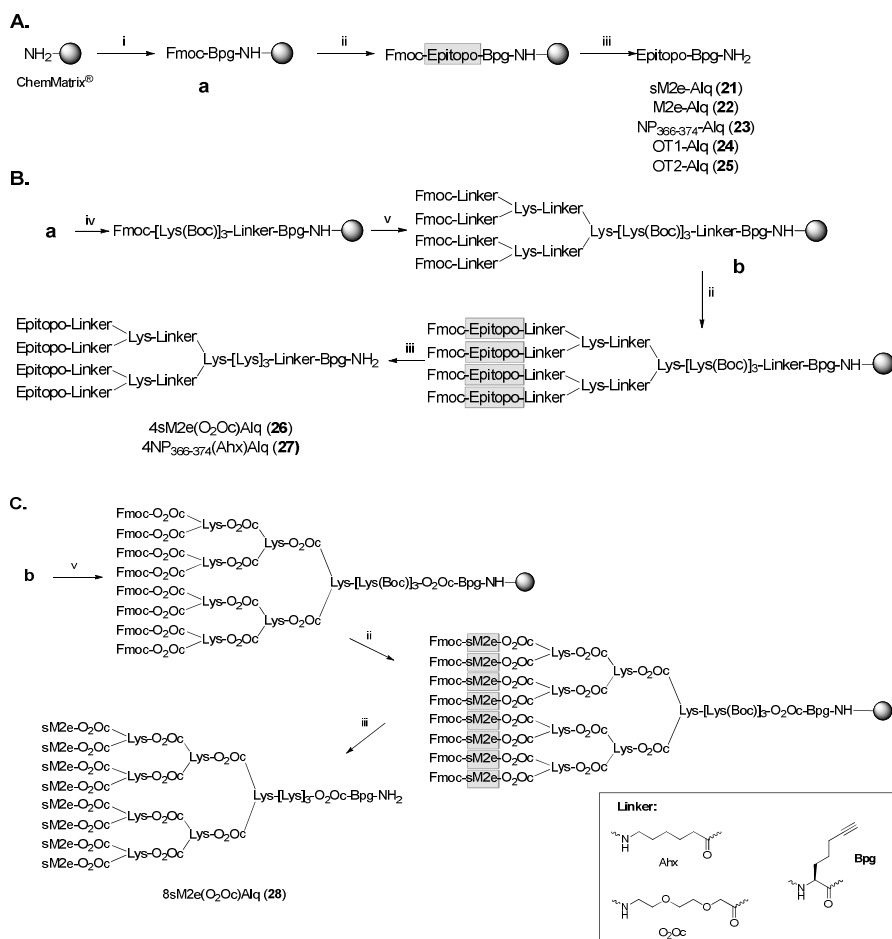
^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 171.9$, 171.4 (COO), 171.3 (CON), 170.3 (COO), 134.21 ($\text{CH}=\text{CH}$), 77.2 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 75.6 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 65.6, 65.4 (CCH_2O), 52.8 ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$), 46.6, 46.1 (CCH_2O), 33.5 (CH_2N), 32.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 17.8 (CH_3), 17.4 (CH_3).

ESI (ESI), calculado para $\text{C}_{46}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_{22}$ (m/z): 1008.3; encontrado: 1009.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

EMAR (ESI), calculado para $\text{C}_{46}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_{22}$ (m/z): 1008.2760; encontrado: 1009.2805 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1026.3086 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 1031.2637 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1047.2377 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

7.3.3. Síntesis de Péptidos y MAPs

7.3.3.1. Síntesis de Péptidos y MAPs funcionalizados con un grupo alquino²⁰⁵



Esquema 48. Rutas sintéticas de los péptidos **21-25** y los MAPs **26-28**. (i) Fmoc-Bpg; (ii) Fmoc-O₂Oc y ciclos de síntesis en fase solida automatizada para completar las diferentes secuencias de amino ácidos; (iii) Acidolisis con TFA; (iv) 3 x Fmoc-Lys(Boc); (v) Fmoc-Lys(Fmoc) y Fmoc-O₂Oc.

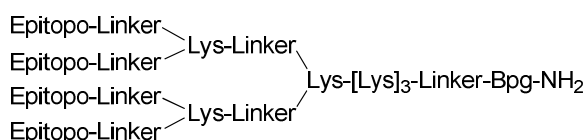
Preparación general de Péptidos Monovalentes **21-25** (A)

Epitopo-Bpg-NH₂

Sobre la resina Rink-amide ChemMatrix (0.05 mmol) se carga la bis-homopropargilglicina protegida con un grupo Fmoc (Fmoc-Bpg) de manera manual (1.25 mmol) utilizando HBTU/HOBt (1.25 mmol) y activación con DIEA (2.5 mmol) en DMF. A esta resina (**a**) se le incorporan los aminoácidos protegidos con Fmoc, correspondientes a las diferentes secuencias, utilizando un sintetizador automático ABI433 (Applied Biosystems) y protocolos Fmoc estándar. Las cadenas laterales se protegen con grupos lábiles a TFA como

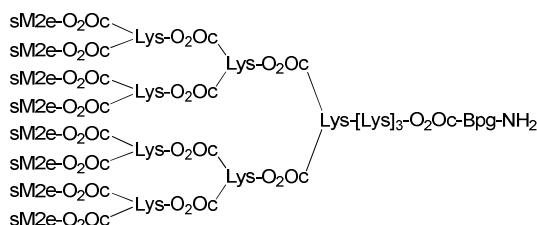
tert-butilo (Glu, Ser, Thr), tert-butiloxycarbonilo (Trp), 2,2,4,6,7-pentametil-2H-benzofuran-5-sulfonilo (Arg) y tritilo (Asn). Los acoplamientos se llevan a cabo con 5 mmol del Fmoc-L-amino ácido correspondiente, HBTU y HOBt, y 10 mmol de DIEA, utilizando DMF como disolvente. Los grupos Fmoc se desprotegen con piperidina al 20% en DMF. Posteriormente, se procede al desanclado de la resina mediante acidólisis con TFA/H₂O/TIS (95:2.5:2.5 v/v, 60 min) para dar el péptido, el cual se aísla por precipitación con Et₂O frío y centrifugación durante 3 x 10 min a 4°C. El crudo se disuelve en AcOH acuoso al 10% (v/v) y se purifica mediante RP-HPLC preparativo utilizando diferentes gradientes de H₂O (0.045% TFA)/ACN (0.036% TFA) en función del péptido.

Preparación general de MAPs Tetravalentes 26-27 (B)



La bis-homopropargilglicina protegida con Fmoc o Fmoc-Bpg (0.05 mmol) se carga sobre la resina Rink-amide ChemMatrix (0.02 mmol) como se ha descrito anteriormente. Después, se acoplan un residuo de O₂Oc y tres de Lys(Boc). La elongación y ramificación con Fmoc-Lys(Fmoc) y Fmoc-O₂Oc, descrita en el esquema, nos lleva a la resina tetravalente **b**, la cual se elonga con cuatro copias de la secuencia peptídica en cuestión. A parte del residuo de Bpg, acoplado manualmente, todo el resto de ciclos sintéticos se llevan a cabo de manera automática utilizando 2 mmol del Fmoc-amino ácido correspondiente, HBTU y HOBt, y 4 mmol de DIEA en DMF. Del primer punto de ramificación (Fmoc-Lys(Fmoc)) en adelante, se hace doble acoplamiento de cada monómero. Una vez tenemos la secuencia protegida completa, se utiliza el protocolo descrito en el apartado anterior para aislar el material peptídico. La purificación mediante RP-HPLC preparativo da lugar a los MAPs **26** y **27** con rendimientos moderados.

MAP 28 (C)

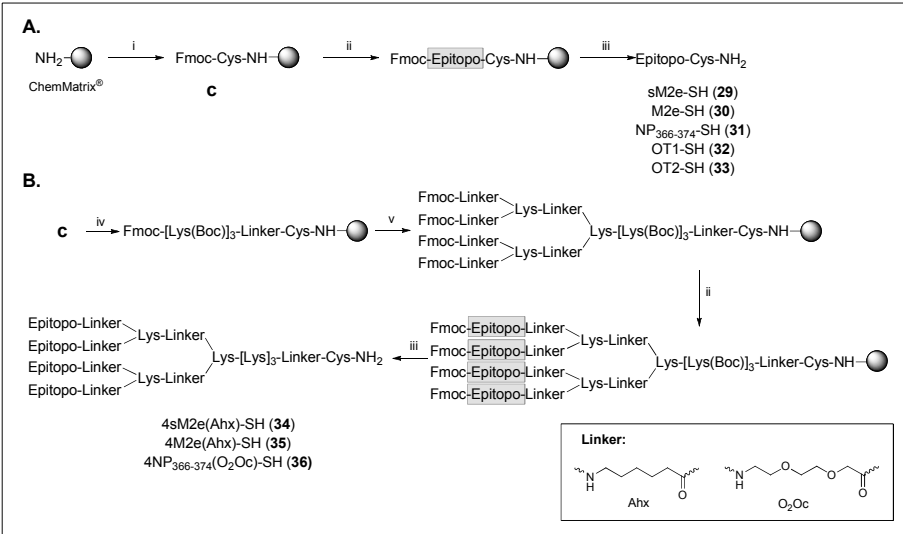


Partiendo de la resina peptídica tretravalente **b** descrita en el esquema, con los diferentes ciclos sintéticos, y los mismos procedimientos de desanclado/desprotección y purificación descritos para los MAPs anteriores, se llega al sistema octavalente con un 7% de rendimiento global.

Compuesto	Composición	PM [mo/av] calculado	PM encontrado
sM2e-Alq (21)	C ₆₉ H ₁₀₃ N ₁₉ O ₂₅	1597.7372/1598.6684	1597.8374
M2e-Alq (22)	C ₁₁₉ H ₁₈₈ N ₃₄ O ₄₇ S	2877.3087/2879.0306	2880.0214
NP₃₆₆₋₃₇₄-Alq (23)	C ₄₅ H ₇₃ N ₁₃ O ₁₈ S ₂	1148.2674/1147.4638	1148.4704
OT1-Alq (24)	C ₅₂ H ₈₃ N ₁₁ O ₁₄	1085.6/1086.3	1086.2
OT2-Alq (25)	C ₈₁ H ₁₂₉ N ₂₇ O ₂₆	1896.0/1897.1	1898.3
4sM2e(O₂Oc)Alq (26)	C ₃₃₁ H ₅₁₇ N ₈₉ O ₁₂₆	7754.6784/7759.1674	7755.7797
4NP₃₆₆₋₃₇₄(Ahx)Alq (27)	C ₂₃₇ H ₄₀₅ N ₆₅ O ₈₂ S ₈	5729.7285/5733.6579	5735.6895
8sM2e(O₂Oc)Alq (28)	C ₆₄₉ H ₁₀₀₉ N ₁₇₃ O ₂₅₂	15258.1457/15266.9637	15258.2932

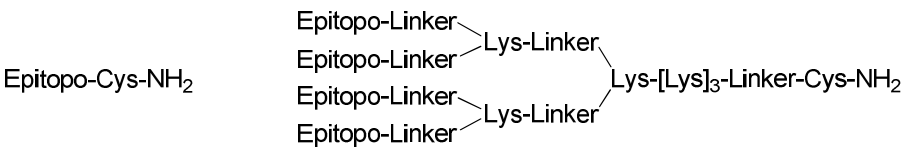
Tabla 11. Péptidos y MAPs provistos con un alquino en su posición focal.

7.3.3.2. Síntesis de Péptidos y MAPs funcionalizados con un grupo tiol¹⁵⁷



Esquema 49. Rutas sintéticas de los péptidos **29-33** y los MAPs **34-36**.

Péptidos 29-33 y MAPs 34-36



La síntesis de estos péptidos y MAPs se ha llevado a cabo siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado anterior, cambiando la bis-homopropargilglicina de la posición focal por una cisteína. Esta cisteína terminal fue introducida mediante un procedimiento automatizado.

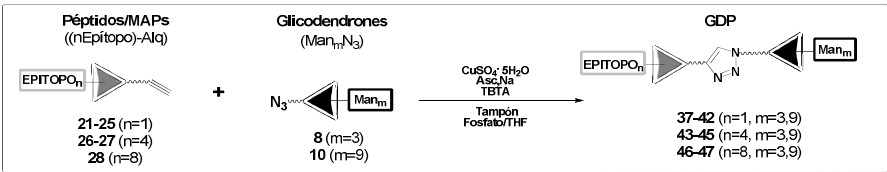
Compuesto	Composición	PM [mo/av]	PM
sM2e-SH (29)	C ₆₅ H ₉₉ N ₁₉ O ₂₅ S	1577.6780/1578.6589	1578.9452
M2e-SH (30)	C ₁₁₅ H ₁₈₄ N ₃₄ O ₄₇ S ₂	2857.2495/2859.0211	2859.2907
NP₃₆₆₋₃₇₄-SH (31)	C ₄₁ H ₆₉ N ₁₃ O ₁₈ S ₃	1128.2579/1127.4046	1128.4105
OT1-SH (32)	C ₄₈ H ₇₉ N ₁₁ O ₁₄ S	1065.5/1066.3	1066.8
OT2-SH (33)	C ₇₇ H ₁₂₅ N ₂₇ O ₂₆ S	1875.9/1877.1	1873.7
4sM2e(Ahx)SH (34)	C ₃₁₇ H ₄₉₈ N ₈₆ O ₁₀₈ S	7269.6/7273.9	7274.3
4M2e(Ahx)SH (35)	C ₅₁₇ H ₈₃₈ N ₁₄₆ O ₁₉₆ S ₅	12387.9/12395.4	12481.5
4NP₃₆₆₋₃₇₄(O₂Oc)SH (36)	C ₂₂₁ H ₃₇₈ N ₆₂ O ₉₂ S ₉	5660.4292/5664.3112	5660.1839

Tabla 12. Péptidos y MAPs con una cisteína como grupo funcional.

7.3.4. Síntesis de Glicodendropéptidos (GPDs)

7.3.4.1. Primera aproximación

a) Método Directo



Esquema 50. Síntesis de GDPs mediante el método directo.

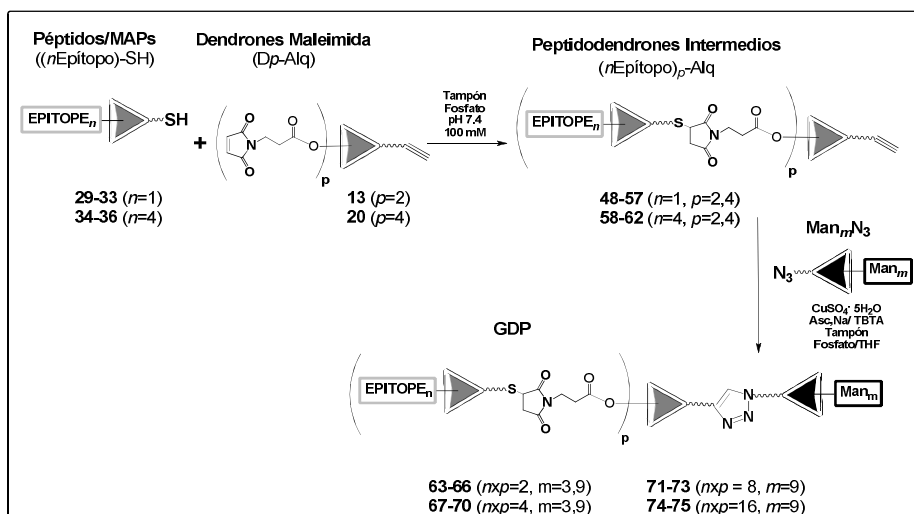
Protocolo general para la síntesis de los GDPs 37-47

Los glicodendrones **8** (0.13 μmol) o **10** (0.26 μmol) se disuelven en THF-Tampón fosfato sódico (100 mM, pH 7.4) (100 μL , 2:3 v/v) junto con el correspondiente péptido (**21-25**) o MAP (**26-28**) (0.13 μmol). En otro vial, una disolución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.13 μmol) en H_2O (15 μL) se añade a otra de TBTA (0.26 μmol) en THF (35 μL). Posteriormente, la mezcla se añade a la primera disolución, seguido de adición de ascorbato sódico (0.52 μmol) en H_2O (50 μL). Tras aproximadamente una hora en agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se liofiliza y se purifica por RP-HPLC para dar los glicodendropéptidos **37-47** con elevado porcentaje de conversión. La caracterización de los compuestos se llevó a cabo por espectrometría de masas, tal y como se recoge en la siguiente tabla.

Compuesto	Composición	PM [mo/av] (calculado)	PM (encontrado)
sM2e-Man₃ (37)	$\text{C}_{113}\text{H}_{173}\text{N}_{31}\text{O}_{50}$	2764.1948/2765.7604	2765.2102
sM2e-Man₉ (38)	$\text{C}_{221}\text{H}_{338}\text{N}_{58}\text{O}_{107}$	5516.2790/5519.3728	5519.3068
M2e-Man₉ (39)	$\text{C}_{271}\text{H}_{423}\text{N}_{73}\text{O}_{129}\text{S}$	6795.9/6799.7	6799.0
NP₃₆₆₋₃₇₄-Man₉ (40)	$\text{C}_{197}\text{H}_{308}\text{N}_{52}\text{O}_{100}\text{S}_2$	5066.0056/5068.9718	5069.0245
OT1-Man₉ (41)	$\text{C}_{204}\text{H}_{318}\text{N}_{50}\text{O}_{96}$	5004.1/5007.0	5004.5
OT2-Man₉ (42)	$\text{C}_{233}\text{H}_{364}\text{N}_{66}\text{O}_{108}$	5814.5/5817.8	5844.7
4sM2e-Man₃ (43)	$\text{C}_{375}\text{H}_{587}\text{N}_{101}\text{O}_{151}$	8921.1359/8926.2594	8926.2813
4sM2e-Man₉ (44)	$\text{C}_{483}\text{H}_{752}\text{N}_{128}\text{O}_{208}$	11673.2/11679.9	11679.3
4NP₃₆₆₋₃₇₄-Man₉ (45)	$\text{C}_{389}\text{H}_{640}\text{N}_{104}\text{O}_{164}\text{S}_8$	9648.2703/9654.3623	9654.2948
8sM2e-Man₃ (46)	$\text{C}_{693}\text{H}_{1079}\text{N}_{185}\text{O}_{277}$	16424.6/16434.1	16436.0
8sM2e-Man₉ (47)	$\text{C}_{801}\text{H}_{1244}\text{N}_{212}\text{O}_{334}$	19176.7/19187.7	19190.0

Tabla 13. GDPs sintetizados mediante el Método Directo de la primera aproximación.

b) Método Indirecto



Esquema 51. Síntesis de GDPs mediante el método indirecto.

Protocolo general para la síntesis de dendropéptidos (48-62)

A una disolución del dendrón de maleimida **13** ò **20** (0.5 μ mol) en CH₃CN (426 μ L), se le añade otra del péptido (1 equivalente por enlace) o el MAP (1.5 equivalentes por maleimida) en tampón fosfato 100 mM, pH 7.4 (853 μ L). Transcurrido el tiempo de reacción, la reacción se para por adición de AcOH glacial (100 μ L) y se purifica mediante RP-HPLC semipreparativo. Los compuestos deseados se obtuvieron puros (>95%) y se caracterizaron satisfactoriamente mediante espectrometría de masas (ver tabla).

Compuesto	Composición	PM [mo/av] (calculado)	PM (encontrado)
(sM2e) ₂ -Alq (48)	C ₁₅₂ H ₂₂₀ N ₄₀ O ₆₀ S ₂	3629.4835/3631.7352	3531.4192
(sM2e) ₄ -Alq (49)	C ₃₀₆ H ₄₄₄ N ₈₀ O ₁₂₂ S ₄	7319.0/7323.5	7319.0
(M2e) ₂ -Alq (50)	C ₂₅₂ H ₃₉₀ N ₇₀ O ₁₀₄ S ₄	6188.6263/6192.4596	6191.8254
(M2e) ₄ -Alq (51)	C ₅₀₆ H ₇₈₄ N ₁₄₀ O ₂₁₀ S ₈	12437.3/12445.0	12444.3
(NP) ₂ -Alq (52)	C ₁₀₄ H ₁₆₀ N ₂₈ O ₄₆ S ₆	2728.9/2730.9	2729.9
(NP) ₄ -Alq (53)	C ₂₁₀ H ₃₂₄ N ₅₆ O ₉₄ S ₁₂	5517.8943/5521.9184	5522.8911
(OT1) ₂ -Alq (54)	C ₁₁₈ H ₁₈₂ N ₂₄ O ₃₈ S ₂	2607.3/2609.0	2608.3

(OT1) ₄ -Alq (55)	C ₂₃₈ H ₃₆₈ N ₄₈ O ₇₈ S ₄	5274.5/5278.0	5275.9
(OT2) ₂ -Alq (56)	C ₁₇₆ H ₂₇₄ N ₅₆ O ₆₂ S ₂	4227.9/4230.5	4222.3
(OT2) ₄ -Alq (57)	C ₃₅₄ H ₅₅₂ N ₁₁₂ O ₁₂₆ S ₄	8515.9/8521.1	8495.8
(4sM2e) ₂ -Alq (58)	C ₆₅₆ H ₁₀₁₈ N ₁₇₄ O ₂₂₆ S ₂	15013.3/15022.3	15022.3
(4sM2e) ₄ -Alq (59)	C ₁₃₁₄ H ₂₀₄₀ N ₃₄₈ O ₄₅₄ S ₄	30086.6/30104.6	30113.0
(4M2e) ₂ -Alq (60)	C ₁₀₅₆ H ₁₆₉₈ N ₂₉₄ O ₄₀₂ S ₁₀	25249.9/25265.2	25304.0
(4NP) ₂ -Alk (61)	C ₄₆₄ H ₇₇₈ N ₁₂₆ O ₁₉₄ S ₁₈	11795.0/11803.0	11796.0
(4NP) ₄ -Alk (62)	C ₄₀₄ H ₆₂₅ N ₁₀₉ O ₁₈₆ S ₄	23645.0/23666.1	23666.0

Tabla 14. Dendropéptidos intermedios sintetizados.

Protocolo general para la síntesis de los GDPs 63-75

Los glicodendrones **8** (0.13 μmol) o **10** (0.26 μmol) se disuelven en THF-tampón fosfato sódico (100 mM, pH 7.4) (100 μL, 2:3 v/v) junto con el correspondiente peptidodendrón (**48-62**) (0.13 μmol). En otro vial, una disolución de CuSO₄·5H₂O (0.13 μmol) en H₂O (15 μL) se añade a otra de TBTA (0.26 μmol) en THF (35 μL). Posteriormente, la mezcla se añade a la primera disolución, seguido de adición de ascorbato sódico (0.52 μmol) en H₂O (50 μL). Tras aproximadamente una hora en agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se liofiliza y se purifica por RP-HPLC para dar los glicodendropéptidos **63-75** con elevado porcentaje de conversión. La caracterización de los compuestos se llevó a cabo por espectrometría de masas, tal y como se recoge en la siguiente tabla.

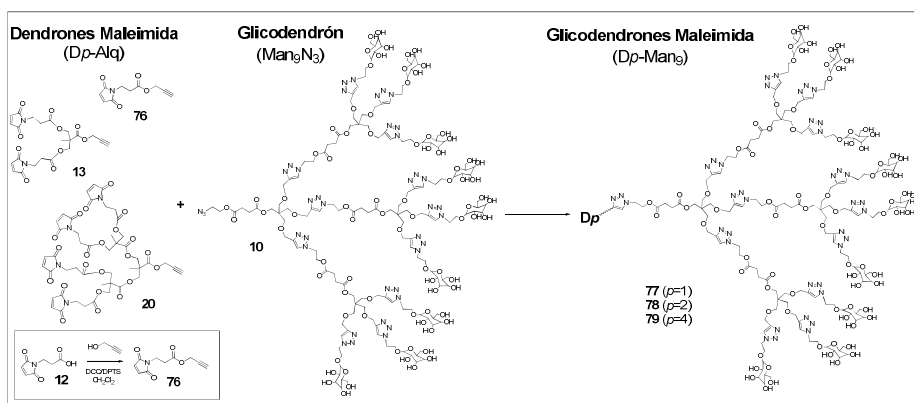
Compuesto	Composición	PM [mo/av] (calculado)	PM (encontrado)
(sM2e) ₂ -Man ₉ (63)	C ₃₀₄ H ₄₅₅ N ₇₉ O ₁₄₂ S ₂	7548.0/7552.4	7548.0
(M2e) ₂ -Man ₃ (64)	C ₂₉₆ H ₄₆₀ N ₈₂ O ₁₂₉ S ₄	7355.1/7359.5	7355.0
(M2e) ₂ -Man ₉ (65)	C ₄₀₄ H ₆₂₅ N ₁₀₉ O ₁₈₆ S ₄	10107.2/10113.2	10113.2
(NP) ₂ -Man ₉ (66)	C ₂₅₆ H ₃₉₅ N ₆₇ O ₁₂₈ S ₆	6647.4783/6651.6376	6652.1324
(sM2e) ₄ -Man ₉ (67)	C ₄₅₈ H ₆₇₉ N ₁₁₉ O ₂₀₄ S ₄	11237.5299/11244.2268	11246.2801
(M2e) ₄ -Man ₃ (68)	C ₅₅₀ H ₈₅₄ N ₁₅₂ O ₂₃₅ S ₈	13603.7/13612.1	13611.8

(M2e) ₄ -Man ₉ (69)	C ₆₅₈ H ₁₀₁₉ N ₁₇₉ O ₂₉₂ S ₈	16355.8156/16365.6756	16356.0658
(NP) ₄ -Man ₉ (70)	C ₃₆₂ H ₅₅₉ N ₉₅ O ₁₇₆ S ₁₂	9436.4360/9442.6228	9441.8254
(4sM2e) ₂ -Man ₉ (71)	C ₈₀₈ H ₁₂₅₃ N ₂₁₃ O ₃₀₈ S ₂	18931.8/18943.0	18951.0
(4M2e) ₂ -Man ₉ (72)	C ₁₂₀₈ H ₁₉₃₂ N ₃₃₃ O ₄₈₃ S ₁₀	29151.4/29168.9	29228.0
(4NP) ₂ -Man ₉ (73)	C ₆₁₆ H ₁₀₁₃ N ₁₆₅ O ₂₇₆ S ₁₈	15713.5/15723.7	15746.0
(4sM2e) ₄ -Man ₉ (74)	C ₁₄₆₆ H ₂₂₇₅ N ₃₈₇ O ₅₃₆ S ₄	34005.1/34025.3	34115.0
(4NP) ₄ -Man ₉ (75)	C ₁₀₈₂ H ₁₇₉₅ N ₂₉₁ O ₄₇₂ S ₃₆	27568.5/27586.8	27600.9

Tabla 15. GDPs sintetizados por el método indirecto.

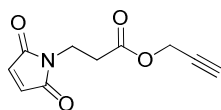
7.3.4.2. Aproximación Divergente

a) Síntesis de los Glicodendrones-Maleimida



Esquema 52. Síntesis de los Glicodendrones-Maleimida intermedios.

Síntesis del derivado monovalente de maleimida 76



Sobre una disolución de ácido 3-maleimido propiónico **12** (100 mg, 0.59 mmol), alcohol propargílico (23 μ L, 0.39 mmol) y DTPS (204 mg, 0.39 mmol) en CH₂Cl₂ (3 mL), se añade otra de DCC (204 mg, 0.99 mmol) en el mismo disolvente (1 mL). Se deja en agitación a temperatura ambiente y atmósfera de argón toda la noche. Transcurrido ese tiempo, se filtra la urea de la DCC y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se

purifica mediante cromatografía en gel de sílice, utilizando como eluyente una mezcla de Hexano/AcOEt (2:1). Se obtiene el producto como un aceite incoloro (80.8 mg, 69%).

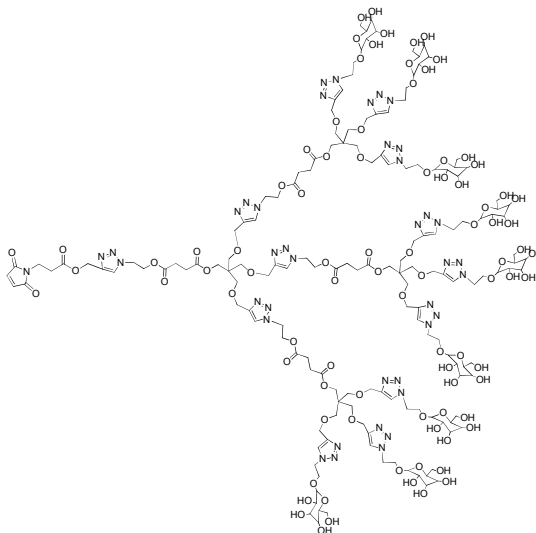
$R_f = 0.57$ Hexano/AcOEt (1:1).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 6.71$ (s, 2H, $\text{CH}_2=\text{CH}_2$), 4.67 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 3.85 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2N), 2.69 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.48 (t, $J = 2.4$ Hz, 2.40 Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$).

^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3): $\delta = 170.2$ (CO), 170.0 (CO), 134.1 ($\text{CH}=\text{CH}$), 77.2 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 75.1 (CH), 52.2 ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 33.3 (CH_2N), 32.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$).

EMAR, calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_4$ (m/z): 207.0532; encontrado: 207.1903 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Síntesis del glicodendrón-maleimida **77**



Sobre una disolución del compuesto **76** (3.40 mg, 16.0 μmol) en DMSO (0.75 mL), se añade otra de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.96 mg, 3.8 μmol) y TBTA (4.05 mg, 7.7 μmol) en una mezcla de H_2O /DMSO (1.25 mL, 2:3 v/v). A continuación, se añade ascorbato sódico (3.03 mg, 16.0 μmol) en H_2O (0.5 mL) y, por último, se adiciona el glicodendrón **10** (10.7 mg, 2.7 μmol) disuelto en H_2O (0.5 mL). Tras 1.5 h en agitación magnética a temperatura ambiente, la reacción ha finalizado. La purificación por cromatografía de exclusión por tamaño G-25 en H_2O , nos da el producto final como un sólido blanco (12.9 mg, 82%). Sin embargo, al quedar cobre quelado al compuesto, fue necesaria

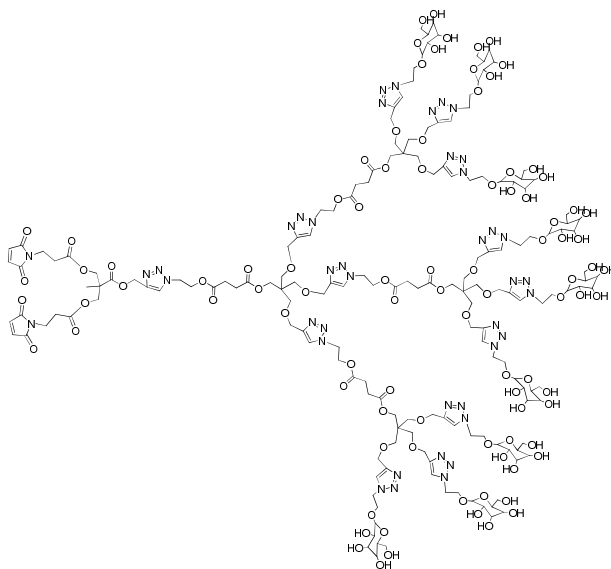
una posterior purificación mediante RP-HPLC semipreparativo, utilizando un gradiente de 15 a 25% de ACN (0.1%TFA) en H₂O (0.1% TFA). Se obtuvo el derivado **77** como un sólido blanco (4.5 mg, 29 %).

¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ = 8.02 (m, 13H, H_{triazol}), 6.74 (s, 2H, H_{maleimida}), 5.12 (s, 2H, CH₂C_{triazol}), 4.68-4.63 (m, 24H, H₁₃, H₈), 4.53-4.47 (m, 30H, H₉, H₁₂), 4.10-4.07 (m, 9H, H₇), 3.93-3.89 (m, 17H, H₇, H₁₁), 3.85 (s, 9H, H₂), 3.74-3.58 (m, 38H, CH₂N_{maleimida}, H₃, H₅, H₆, H_{6'}), 3.40-3.67 (m, 24H, H₁₀), 3.16-3.00 (m, 9H, H₄), 2.65 (t, J = 6.7 Hz, 2H, CH₂CH₂N_{maleimida}), 2.51 (s, 16H, CH₂succínico).

EM (MALDI-TOF), calculado para C₁₆₂H₂₄₄N₄₀O₈₆ (m/z): 4127.9; encontrado: 4151.6 [M+Na]⁺.

EMAR, calculado para C₁₆₂H₂₄₄N₄₀O₈₆ (m/z): 4125,5949; encontrado: 2075.8076 [M+H+Na]²⁺, 1384.2007 [M+2H+Na]³⁺, 1384.2007 [M+3H+Na]⁴⁺.

Síntesis del glicodendrón-maleimida **78**



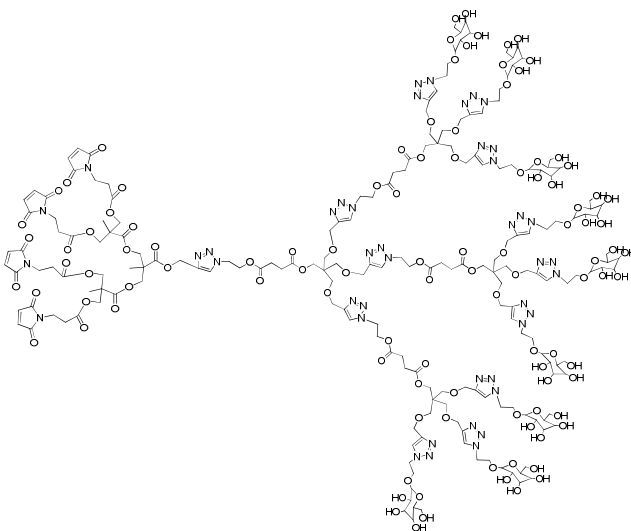
Sobre una disolución del compuesto **13** (4.5 mg, 9.5 μ mol) en DMSO (0.75 mL), se añade otra de CuSO₄·5H₂O (0.5 mg, 1.4 μ mol) y TBTA (2 mg, 3.8 μ mol) en una mezcla de H₂O/DMSO (1.25 mL, 2:3 v/v). A continuación, se añade ascorbato sódico (1.5 mg, 7.6 μ mol) en H₂O (0.5 mL) y, por último, se adiciona el glicodendrón **10** (15 mg, 3.8 μ mol) disuelto en H₂O (0.5 mL). Tras 1.5 h en agitación magnética a temperatura ambiente, la reacción ha

finalizado. La purificación por cromatografía de exclusión por tamaño G-25 en H₂O, nos da el producto final como un sólido blanco (13.7 mg, 82%). Sin embargo, al quedar cobre quelado al compuesto, fue necesaria una posterior purificación mediante RP-HPLC semipreparativo, utilizando un gradiente de 12 a 50% de ACN (0.1% TFA) en H₂O (0.1% TFA). Se obtuvo el derivado **78** como un sólido blanco (3.9 mg, 23 %).

¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ = 8.07-8.01 (m, 13H, H_{triazol}), 6.81 (s, 4H, H_{maleimida}), 5.21 (s, 2H, CH₂C_{triazol}), 4.69-4.63 (m, 24H, H₁₃, H₈), 4.53-4.47 (m, 30H, H₉, H₁₂), 4.16 (s, 4H, CCH₂O), 4.09-4.07 (m, 9H, H₇), 3.93-3.85 (m, 26H, H₇, H₁₁, H₂), 3.75-3.58 (m, 40H, CH₂N_{maleimida}, H₃, H₅, H₆, H_{6'}), 3.40 (s, 24H, H₁₀), 3.10-3.07 (m, 9H, H₄), 2.58-2.51 (m, 20H, CH₂CH₂N_{maleimida}, CH₂succínico), 1.18 (s, 3H, CH₃).

EM (MALDI-TOF), calculado para C₁₇₄H₂₅₇N₄₁O₉₂ (m/z): 4392,1; encontrado: 4392.5.

Síntesis del glicodendrón-maleimida **79**



Sobre una disolución del compuesto **20** (7.2 mg, 7.1 μ mol) en DMSO (0.93 mL), se añade otra de CuSO₄·5H₂O (0.6 mg, 2.4 μ mol) y TBTA (2.5 mg, 4.8 μ mol) en una mezcla de H₂O/DMSO (1.55 mL, 2:3 v/v). A continuación, se añade ascorbato sódico (1.9 mg, 9.5 μ mol) en H₂O (0.6 mL) y, por último, se adiciona el glicodendrón **10** (9.3 mg, 2.4 μ mol) disuelto en H₂O (0.6 mL). Tras 1.5 h en agitación magnética a temperatura ambiente, la reacción ha finalizado. La purificación por cromatografía de exclusión por tamaño G-25 en H₂O, da lugar al producto final como un sólido blanco (10.6 mg, 91%). Sin

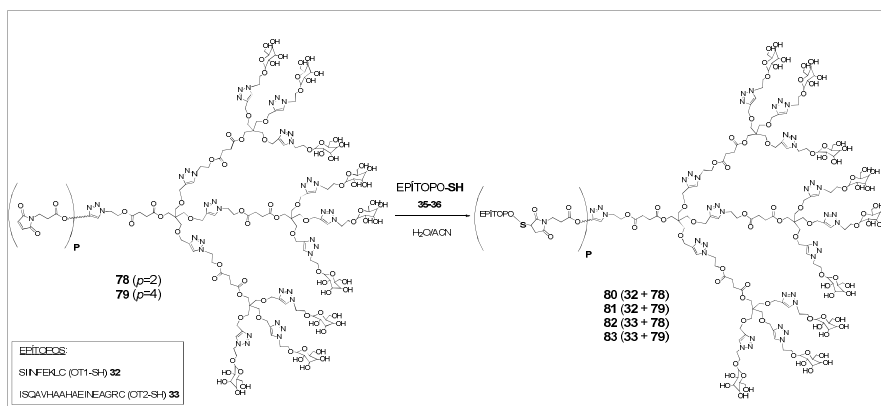
embargo, al quedar cobre quelado al compuesto, fue necesaria una posterior purificación mediante RP-HPLC semipreparativo, utilizando un gradiente de 12 a 50% de ACN (0.1% TFA) en H₂O (0.1% TFA). Se obtuvo el derivado **79** como un sólido blanco (2.3 mg, 20 %).

¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ = 8.10-8.01 (m, 13H, H_{triazol}), 6.83 (s, 8H, H_{maleimida}), 5.23 (s, 2H, CH₂C_{triazol}), 4.69-4.63 (m, 24H, H₁₃, H₈), 4.53-4.47 (m, 30H, H₉, H₁₂), 4.23-4.08 (m, 21H, CCH₂O, H₇), 3.94-3.85 (m, 26H, H₇, H₁₁, H₂), 3.74-3.58 (m, 44H, CH₂N_{maleimida}, H₃, H₅, H₆, H₆'), 3.40 (s, 24H, H₁₀), 3.09 (m, 9H, H₄), 2.65 (t, J = 6.4 Hz, 8H, CH₂CH₂N_{maleimida}), 2.52 (s, 1H, CH₂succínico), 1.22 (s, 3H, CH₃), 1.11 (s, 6H, CH₃).

EM (MALDI-TOF), calculado para C₁₉₈H₂₈₃N₄₃O₁₀₄ (m/z): 4929,6; encontrado: 4952.3 [M+Na]⁺.

EMAR, calculado para C₁₇₄H₂₅₇N₄₁O₉₂ (m/z): 4926,8178; encontrado: 1657.9384 [M+H+2Na]³⁺.

b) Síntesis de Glicodendropéptidos



Esquema 53. Síntesis de GDPs siguiendo la aproximación divergente.

Procedimiento general para la síntesis de los GDPs 80-83 mediante la estrategia divergente

A una disolución del glicodendrón-maleimida **78** ò **79** (0.5 µmol) en CH₃CN (426 µL), se le añade otra del péptido (1 equivalente por enlace) en tampón fosfato 100 mM, pH 7.4 (853 µL). Transcurrido el tiempo de reacción, la reacción se para por adición de AcOH glacial (100 µL) y se purifica mediante RP-HPLC semipreparativo. Los compuestos deseados se obtuvieron puros

(>95%) y se caracterizaron satisfactoriamente mediante espectrometría de masas (ver tabla).

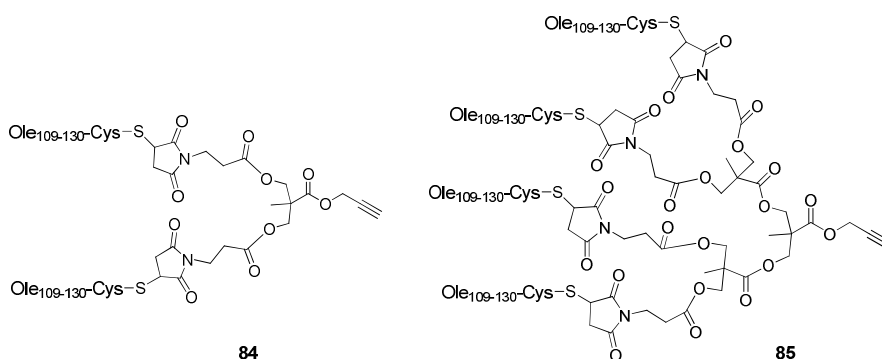
Compuesto	Composición	PM [mo/av] (calculado)	PM (encontrado)
(OT1) ₂ -Man ₉ (80)	C ₂₇₀ H ₄₁₇ N ₆₃ O ₁₂₀ S ₂	6525.8/6529.7	6511.5
(OT1) ₄ -Man ₉ (81)	C ₃₉₀ H ₆₀₃ N ₈₇ O ₁₆₀ S ₄	9193.1/9198.7	9220.9
(OT2) ₂ -Man ₉ (82)	C ₃₂₈ H ₅₀₉ N ₉₅ O ₁₄₄ S ₂	8146.5/8151.2	8149.8
(OT2) ₄ -Man ₉ (83)	C ₅₀₆ H ₇₈₇ N ₁₅₁ O ₂₀₈ S ₄	12434.5/12441.8	12443.4

Tabla 16. GDPs sintetizados mediante la aproximación divergente.

7.3.5. Síntesis de Conjugados ADN-dendropéptido

7.3.5.1. Síntesis de Dendropéptidos del Alergeno Ole₁₀₉₋₁₃₀

Protocolo general para la síntesis de los dendropéptidos de Ole₁₀₉₋₁₃₀ (84-85)



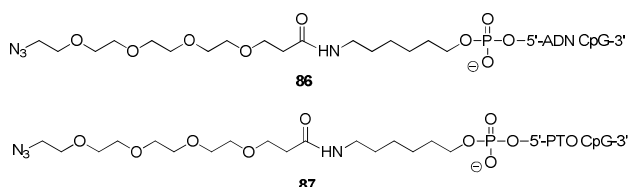
A una disolución del glicodendrón-maleimida **13** ÷ **20** (0.5 μmol) en CH₃CN (426 μL), se le añade otra del péptido Ole₁₀₉₋₁₃₀ (1 equivalente por enlace) en tampón fosfato 100 mM, pH 7.4 (853 μL). Transcurrido el tiempo de reacción, la reacción se para por adición de AcOH glacial (100 μL) y se purifica mediante RP-HPLC semipreparativo. Los compuestos deseados se obtuvieron puros (>95%) y se caracterizaron satisfactoriamente mediante espectrometría de masas (ver tabla).

Compuesto	PM (calculado)	PM (encontrado)
(Ole ₁₀₉₋₁₃₀) ₂ -Alq (84)	5516.6	5539.5
(Ole ₁₀₉₋₁₃₀) ₄ -Alq (85)	11092.4	11115.8

Tabla 17. Dendropéptidos funcionalizados con el alérgeno Ole₁₀₉₋₁₃₀.

7.3.5.2. Síntesis de ADN y PTO Adecuadamente Funcionalizados

Protocolo general para la síntesis de los ODN provistos de un grupo azida (86-87)



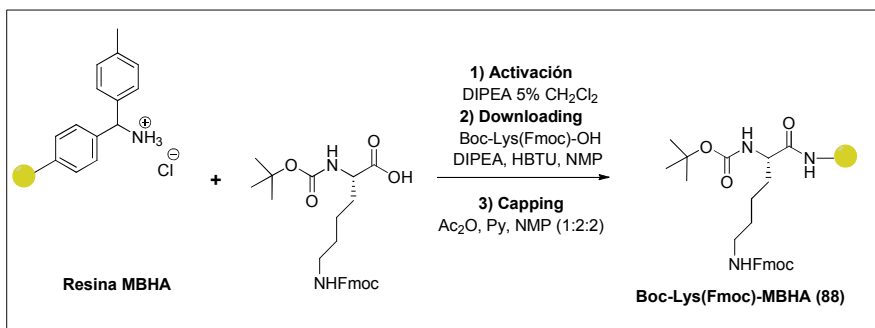
Sobre una disolución de ODN (0.5 mg, 71.5 nmol) en tampón NaCO₃/NaHCO₃ 0.5 M, pH=8.75 (115 µL), se añade otra del espaciador N3-dPEG(4)-NHS comercial (9.58 mg, 24.7 µmol) en DMSO (34.5 µL) y se deja en agitación a temperatura ambiente durante 4 horas. Transcurrido ese tiempo, se pasa el crudo de reacción por una NAD-5, obteniéndose el producto deseado con buenos rendimientos.

Compuesto	PM (calculado)	PM (encontrado)
ADNCpG-N ₃ (86)	7265.1	7267.0
PTOCpG-N ₃ (87)	7605.3	7605.6

Tabla 18. Oligonucleótidos CpG preparados con un grupo azida en uno de sus extremos.

7.3.6. Síntesis de PNAs y sus Correspondientes Conjugados

7.3.6.1. Síntesis en Fase Sólida de las Secuencias de PNA

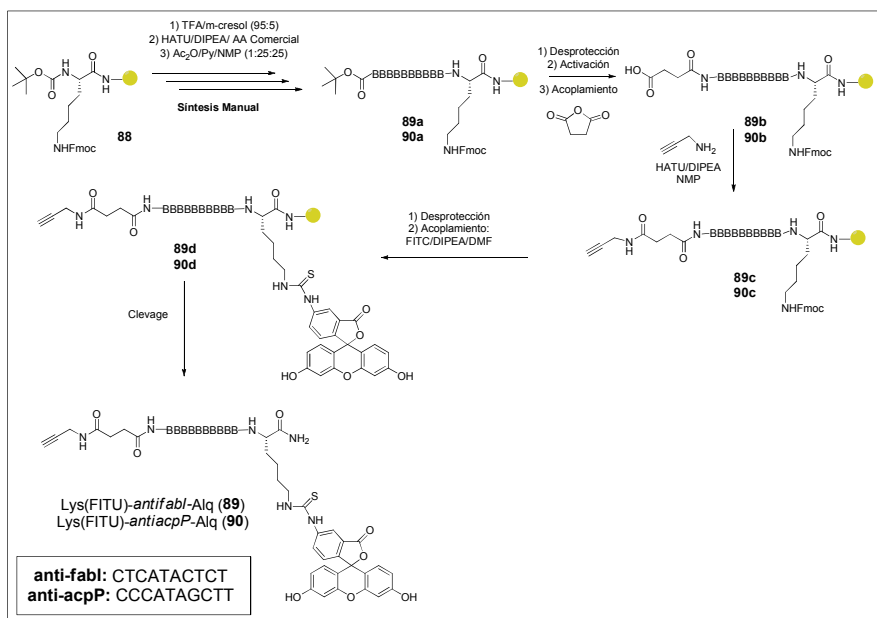


Esquema 54. Downloading de la resina MBHA con el amino ácido *Boc-Lys(Fmoc)* 88.

Síntesis de la resina Boc-Lys(Fmoc)-MBHA (88)

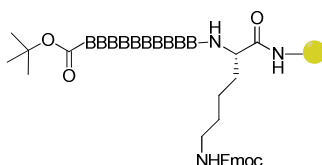
La resina MBHA (540 mg), se transfiere a una jeringa de fase sólida y se deja expandir en CH_2Cl_2 durante una hora. Una vez transcurrido este tiempo, se elimina el disolvente por filtración y se adiciona una disolución al 5% en volumen de DIPEA en CH_2Cl_2 (3 mL) y se deja en agitación durante 3 minutos. Se lava tres veces con CH_2Cl_2 . A continuación, se disuelve la Boc-Lys(Fmoc)-OH (51 mg, 0.11 mmol) en NMP (1 mL) y se le añade HBTU (41 mg, 0.11 mmol) y DIPEA (37 μL , 0.22 mmol). Dicha disolución se transfiere a la jeringa de fase sólida y se deja toda la noche en agitación orbital. Posteriormente, se lava tres veces con NMP y se adiciona una disolución de *capping* de NMP/Piridina/ Ac_2O (2:2:1) (2 mL), dejando reaccionar durante una hora y media. Una vez finaliza el tiempo de reacción, se realiza un test de Kaiser para asegurarse que todos los grupos amino de la resina que no han reaccionado se han acetilado. Para llevar a cabo el test, se extraen unos pocos granos de la resina de la jeringa de reacción y se transfieren a un tubo de reacción. Tras lavado con EtOH, se añaden tres gotas de fenol al 80% en EtOH, tres gotas de KCN en una mezcla de H_2O /Piridina y, por último, tres gotas de ninhidrina al 6% en EtOH. La mezcla así obtenida, se calienta a 120°C durante 5 minutos. Si tanto los granos de resina como la disolución adquieren un color azul oscuro es necesario un nuevo acoplamiento ya que quedan grupos amino libres. Si por el contrario, mantienen el color amarillento, el proceso de *capping* ha tenido lugar con éxito y puede continuarse con la síntesis.

Se lava, entonces, con NMP y tres veces con una secuencia de MeOH/ CH_2Cl_2 y, por último, con CH_2Cl_2 . La resina se deja secar a presión reducida.



Esquema 55. Síntesis en fase sólida manual de los PNAs funcionalizados con un grupo alquino y una fluoresceína.

Procedimiento general para la síntesis del Boc-amino-[decámero-PNA]-Lys(Fmoc)-MBHA (89a-90a)



La resina **88** (100 mg, 0.02 mmol/g) se transfiere a una jeringa de síntesis en fase sólida y se deja expandir durante 30 minutos en CH₂Cl₂. Posteriormente, se hacen dos ciclos de desprotección durante 4 minutos, utilizando para ello una mezcla de TFA/m-cresol (95:5) (3 mL). Entre los dos ciclos, se lava la resina con CH₂Cl₂ y después con tres ciclos de CH₂Cl₂, tres de NMP y, por último, tres de CH₂Cl₂. A continuación, se activa la resina utilizando una disolución de DIPEA al 5% en volumen en CH₂Cl₂ (2 × 3 mL, 2 minutos). Se lava con CH₂Cl₂ tres veces.

El acoplamiento de cada base se lleva a cabo disolviendo la base (3 equivalentes) en NMP (500 µL). A dicha disolución se le añade otra de HATU (2.7 equivalentes) en el mismo disolvente (500 µL) y, por último, la

DIPEA (6 equivalentes). La mezcla se transfiere a la jeringa de reacción y se deja en agitación a temperatura ambiente dos horas.

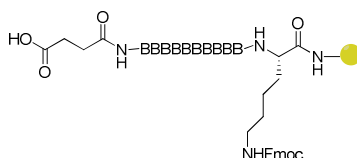
Transcurrido este tiempo, se filtra el disolvente y se lava con tres ciclos de NMP y tres de CH₂Cl₂. A continuación, se procede al *capping* de los grupos amino que no hayan reaccionado, utilizando para ello una mezcla de Ac₂O/Py/NMP (1:25:25) (2 × 2mL, 1 minuto). Por último, se lava con tres ciclos de CH₂Cl₂, tres de NMP, tres de CH₂Cl₂ y la resina se seca a presión reducida.

Este proceso se repite para el acoplamiento de cada base. Este protocolo se resume en la siguiente tabla.

Secuencia: C'→N'	T	C	T	C	A	T	A	C	T	C
Expansión de la resina:										
CH ₂ Cl ₂ , 30 min										
Desprotección:										
TFA/ <i>m</i> -cresol, 95:5, 3 mL, 4 min										
CH ₂ Cl ₂										
TFA/ <i>m</i> -cresol, 95:5, 3 mL, 4 min										
CH ₂ Cl ₂ x 3										
NMP x 3										
CH ₂ Cl ₂ x 3										
DIPEA, 5% en CH ₂ Cl ₂ , 3 mL, 3 min										
CH ₂ Cl ₂										
DIPEA, 5% en CH ₂ Cl ₂ , 3 mL, 3 min										
CH ₂ Cl ₂ x 3										
Acoplamiento:										
mon en NMP										
HATU en NMP										
mon+HATU+DIPEA en NMP, 2 min										
Adición a la resina, 2 horas										
NMP x 3										
CH ₂ Cl ₂ x 3										
Capping:										
Ac ₂ O/Py/NMP (1:25:25), 2 mL, 1 min										
CH ₂ Cl ₂										
Ac ₂ O/Py/NMP (1:25:25), 2 mL, 1 min										
CH ₂ Cl ₂ x 3										
NMP x 3										
CH ₂ Cl ₂ x 3										
Secado a vacío										

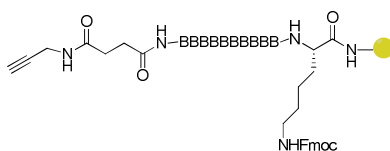
Tabla 19. Protocolo de síntesis en fase sólida de PNAs. Se ejemplifica la síntesis de la secuencia de *anti-fabI* comenzando por el C' (*mon*: monómero de PNA).

Síntesis del ácido succinil-[decámero-PNA]-Lys(Fmoc)-MBHA (89b-90b)²⁷¹



El Boc-amino-[decámero-PNA]-Lys(Fmoc)-MBHA (**89a**, **90a**) contenido en la jeringa para síntesis en fase sólida se deja expandir en CH_2Cl_2 durante media hora. A continuación, se llevan a cabo dos ciclos de desprotección del grupo Boc durante 4 minutos (TFA/m-cresol, 95:5) (3 mL). Se lava la resina con tres ciclos de CH_2Cl_2 , tres de NMP y, por último, tres de CH_2Cl_2 . Posteriormente, se adiciona una disolución de DIPEA al 5% en CH_2Cl_2 ($2 \times 3\text{ mL}$, 2 minutos) y se lava con tres ciclos de CH_2Cl_2 . Por último, se adiciona el anhídrido succínico (20 equivalentes) en NMP (2 mL) y se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 4 horas. Finalizado este tiempo, de lava con ciclos de $3 \times \text{CH}_2\text{Cl}_2 / 3 \times \text{NMP} / 3 \times \text{CH}_2\text{Cl}_2$ y $3 \times \text{CH}_2\text{Cl}_2 / 3 \times \text{MeOH} / 3 \times \text{CH}_2\text{Cl}_2$. Por último, la resina se seca a presión reducida.

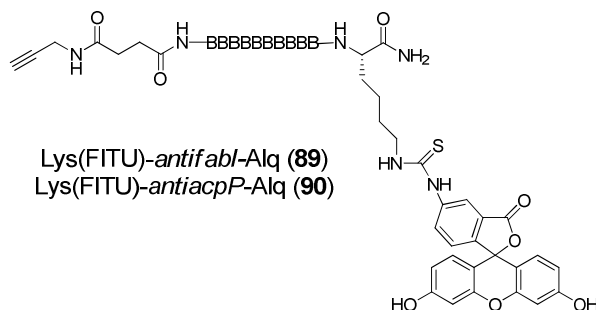
Síntesis del propargil-[decámero-PNA]-Lys(Fmoc)-MBHA (89c-90c)



El ácido succinil-[decámero-PNA]-Lys(Fmoc)-MBHA (**89b**, **90b**) se deja expandir en CH_2Cl_2 durante media hora. Se añade, entonces, una disolución de HATU (4.8 equivalentes), DIPEA (10 equivalentes) en NMP (1.5 mL) y se agita durante 2 minutos. A continuación, se adiciona la propargil amina (5 equivalentes) en NMP (0.5 mL) y se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. Trascurrido dicho tiempo, se elimina el disolvente y se lava con ciclos de $3 \times \text{CH}_2\text{Cl}_2 / 3 \times \text{NMP} / 3 \times \text{CH}_2\text{Cl}_2$ y $3 \times \text{CH}_2\text{Cl}_2 / 3 \times \text{MeOH} / 3 \times \text{CH}_2\text{Cl}_2$. Por último, la resina se seca a presión reducida.

²⁷¹ A. Valla, D. Cartier, F. Zentz, R. Labia, *Synth. Commun.*, **2006**, 36, 3591-3597.

Síntesis del propargil-[decámero-PNA]-Lys(FITU)-MBHA (89-90)²⁷²



El propargil-[decámero-PNA]-Lys(Fmoc)-MBHA (**89c**, **90c**) se deja expandir en CH_2Cl_2 durante una hora. Posteriormente, se lava tres veces con una disolución de piperidina al 20% en DMF (3 mL) para desproteger la cadena lateral del residuo lisínico, dejando en agitación 3 minutos cada vez. A continuación, se lava con DMF. Por otro lado, la fluoresceína isotiocianato (4 equivalentes) se disuelve en DMF (1.8 mL) y se le añade la DIPEA (8 equivalentes). Esta disolución se trasfiere a la jeringa y se deja en agitación toda la noche. Tras ese tiempo, se lava seis veces con DMF/ CH_2Cl_2 y, por último, se seca a vacío.

A continuación, se procede a desanclar el PNA de la resina. Para ello, se lava la resina 2 veces con TFA y se le adiciona la disolución de *cleavage* (TFA/TFMSA/m-cresol/tioanisol 6:2:1:1) (1 mL). Se deja en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Se filtra y se recoge la disolución en un tubo de centrífuga. Se lava la resina con TFA (x6), recogiendo siempre en el mismo tubo. Posteriormente, se eliminan los volátiles utilizando un flujo de nitrógeno hasta obtener un aceite marrón. Se adiciona entonces Et_2O frío, formándose un precipitado amarillo y fluorescente. Se deja el tubo a -20°C durante 1 hora, se centrifuga y se elimina el éter con una pipeta Pasteur. Se añade más éter, lavando bien el precipitado y se vuelve a centrifugar. Este paso se repite cuatro/cinco veces. Se seca el crudo de PNA primero con corriente de nitrógeno y luego a vacío.

El crudo así obtenido, se purifica utilizando RP-HPLC con una columna C18 Phenomenex semipreparativa (10 μ , 10 \times 250 mm) y un gradiente de 5 a 100 % de una disolución B en otra disolución A en 180 minutos a flujo de 0.9 mL/min (Tabla 19). B corresponde a una disolución de TFA en CH_3CN al 0.1% y A a una de TFA en H_2O , también al 0.1%.

²⁷² J. Lohse, P. E. Nielsen, N. Harrit, O. Dahl, *Bioconjugate Chem.*, **1997**, 8, 503-509.

t/min	% A	% B	Flujo (mL/min)
0	95	5	0.9
180	0	100	0.9
182	95	5	3
184	95	5	3
185	95	5	0.9
190	95	5	0.9

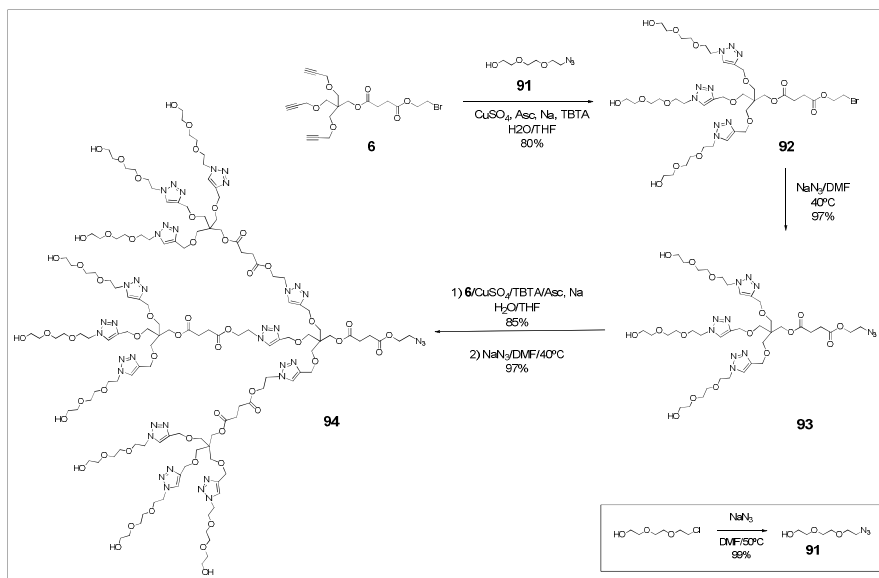
Tabla 20. Método de purificación mediante RP-HPLC (B: CH₃CN al 0.1% de TFA, y A: H₂O, al 0.1% de TFA).

De esta forma se obtienen las secuencias **89** y **90** con rendimientos del 17% y del 15%, respectivamente. La pureza se comprobó mediante HPLC y espectroscopía de masas MALDI-TOF.

Compuesto	R%	Composición	PM [mo/av] (calculado)	PM (encontrado)
<i>antifabI</i> (89)	17%	C ₁₄₀ H ₁₆₆ N ₅₈ O ₃₉ S	3317.2/3315.3	3318.3
<i>antiacpP</i> (90)	15%	C ₁₄₀ H ₁₆₇ N ₅₅ O ₄₀ S	3292.2/3290.2	3292.5

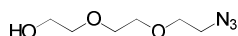
Tabla 21. Secuencias de PNA sintetizadas en fase sólida.

7.3.6.2. Síntesis del Control Negativo de Etilenglicol



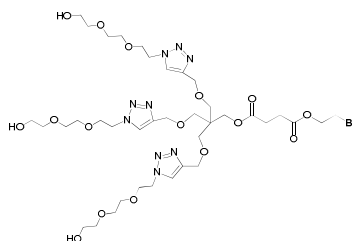
Esquema 56. Ruta sintética para la obtención del control negativo novalente **94**.

2-[2-(2-Azidoetoxi)-etoxi]-etanol (**91**)²⁶⁷



Sobre una suspensión de NaN_3 (2.9 mg, 45.6 mmol) en DMF (20 mL) se añade el 2-[2-(2-cloroetoxi)-etoxi]-etanol (830 μL , 5.7 mmol) y se lleva a 80°C . Se mantiene en agitación a dicha temperatura durante toda la noche. Transcurrido ese tiempo, el crudo de reacción se redissuelve en AcOEt y se lava H_2O (3×30 mL). La fase orgánica se seca sobre sulfato sódico, se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida, obteniéndose el producto deseado como un aceite amarillo (990 mg, 99%).

Derivado **92**



A una disolución del compuesto **6** (49 mg, 100 μmol) y del 2-[2-(2-azidoetoxi)-etoxi]-etanol **91** (62 mg, 353 μmol) en 0.37 mL de $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$

(1:1), se añade otra de TBTA (10.6 mg, 20.0 μmol) y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2.5 mg, 10.0 μmol) en 0.37 mL del mismo disolvente. Por último, se añade el ascorbato sódico (8 mg, 40.0 μmol) disuelto en H_2O (0.1 mL). La mezcla de reacción se deja en agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. Transcurrido ese tiempo, se adiciona la resina Quadrasil[®]MP y se agita 5 minutos. El crudo se filtra y se purifica mediante Sephadex LH-20 (MeOH 100%) para dar el compuesto **92** como un aceite incoloro (78.6 mg, 80%).

R_f : 0.26 en $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$ (9:1).

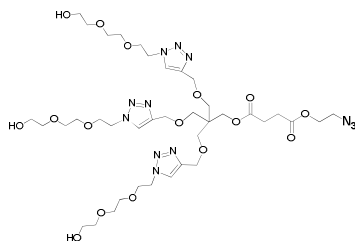
^1H RMN (400 MHz, CD_3OD): δ = 8.02 (s, 3H, $\text{H}_{\text{triazol}}$), 4.58 (t, J = 5.1 Hz, 6H, $\text{CH}_2\text{N}_{\text{triazol}}$), 4.53 (s, 6H, H_3), 4.37 (t, J = 5.9 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$), 4.08 (s, 2H, H_1), 3.90 (t, J = 5.1 Hz, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_{\text{triazol}}$), 3.68 - 3.54 (m, 20H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, CH_2Br), 3.51 (t, J = 5.5, 6H, CH_2OH), 3.48 (s, 6H, H_2), 2.63-2.54 (m, 4H, CH_2 succínico).

^{13}C RMN (101 MHz, CD_3OD): δ = 173.6 (CO), 146.6 ($\text{C}_{\text{triazol}}$), 125.9 ($\text{CH}_{\text{triazol}}$), 73.7 (CH_2OH), 71.4 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 71.4 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 70.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_{\text{triazol}}$), 69.8 ($\text{CH}_{(2)}$), 65.5 ($\text{CH}_{(3)}$), 65.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$), 64.6 ($\text{CH}_{(1)}$), 62.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 51.4 ($\text{CH}_2\text{N}_{\text{triazol}}$), 45.6 ($\text{C}_{\text{pentaeritritol}}$), 29.9 (CH_2Br), 29.9 (CH_2 succínico), 29.7 (CH_2 succínico).

EM(ESI) calculado para $\text{C}_{38}\text{H}_{64}\text{BrN}_9\text{O}$ (m/z): 982.9; encontrado: 1006.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

EMAR (FAB) calculado para $\text{C}_{38}\text{H}_{64}\text{BrN}_9\text{O}$ (m/z): 982.8695; encontrado: 1006.3544 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Compuesto trivalente 93



Una suspensión del compuesto **92** (197 mg, 0.2 mmol) y NaN_3 (104 mg, 1.6 mmol) en DMF (2.0 mL) se mantiene en agitación a 40°C durante toda la noche. Transcurrido ese tiempo, se filtra el exceso de NaN_3 y se evapora el disolvente. El crudo de reacción se purifica mediante Sephadex LH20 (MeOH 100%) dando el dendrón **93** como un aceite incoloro (184 mg, 97%).

$R_f = 0.24$ en $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (9:1).

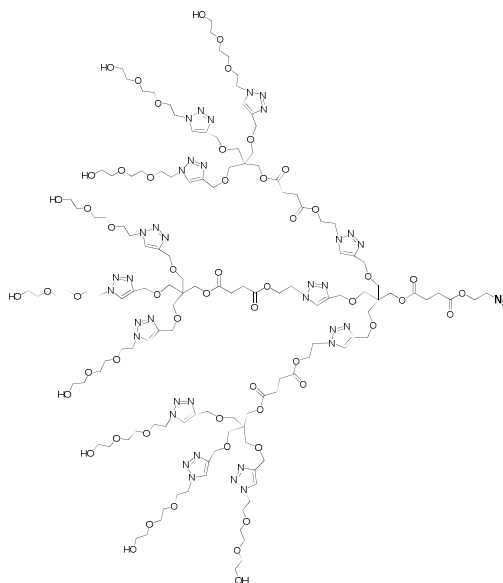
^1H RMN (500 MHz, CD_3OD): $\delta = 7.99$ (s, 3H, $\text{H}_{\text{triazol}}$), 4.59 (t, $J = 9.8$ Hz, 6H, $\text{CH}_2\text{N}_{\text{triazol}}$), 4.53 (s, 6H, H_3), 4.23 (d, $J = 5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 4.08 (s, 2H, H_1), 3.85 (t, $J = 9.8$ Hz, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_{\text{triazol}}$), 3.71 - 3.55 (m, 18H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 3.54 - 3.49 (m, 8H, CH_2N_3 , CH_2OH), 3.47 (s, 6H, H_2), 2.79 - 2.38 (m, 4H, CH_2 succínico).

^{13}C RMN (126 MHz, CD_3OD): $\delta = 173.5$ (CO), 145.9 ($\text{C}_{\text{triazol}}$), 125.8 ($\text{CH}_{\text{triazol}}$), 73.7 (CH_2OH), 71.4 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 71.4 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 70.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_{\text{triazol}}$), 69.8 ($\text{CH}_{(2)}$), 65.3 ($\text{CH}_{(3)}$), 64.6 ($\text{CH}_{(1)}$), 64.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 62.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 51.3 ($\text{CH}_2\text{N}_{\text{triazol}}$), 50.9 (CH_2N_3), 45.6 ($\text{C}_{\text{pentaeritritol}}$), 29.8 (CH_2 succínico), 29.8 (CH_2 succínico).

EM (ESI) calculado para $\text{C}_{38}\text{H}_{64}\text{N}_{12}\text{O}_{16}$: 945.0; encontrado: 967.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

EMAR (FAB) calculado para $\text{C}_{38}\text{H}_{64}\text{N}_{12}\text{O}_{16}$: 944.9856; encontrado: 967.4456 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Derivado nonavalente **94**



A una disolución del compuesto **6** (12 mg, 26 μmol) y del dendrón **93** (89.4 mg, 95 μmol) en 0.62 mL de $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ (1:1), se añade otra de TBTA (11.0 mg, 20 μmol) y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2.6 mg, 10 μmol) en 0.62 mL del mismo disolvente. A continuación, se añade el ascorbato sódico (8.2 mg, 40 μmol) en

H₂O (0.15 mL) y la mezcla de reacción se mantiene en agitación durante 3 h. Al cabo de este tiempo, se añade la resina Quadrasil[®]MP agitando 5 minutos. El crudo se filtra y se purifica mediante cromatografía por exclusión de tamaño (Sephadex G-25, H₂O/MeOH 9:1), obteniendo el correspondiente derivado nonavalente bromado como un aceite incoloro (71.8 mg, 85%). A continuación, una suspensión de dicho derivado (59 mg, 18 μmol) y NaN₃ (9.3 mg, 143 μmol) en DMF (0.80 mL) se mantiene en agitación a 40°C durante toda la noche. Transcurrido ese tiempo, se filtra el exceso de NaN₃, se evapora el disolvente y se purifica mediante Sephadex G-25 (H₂O/MeOH, 9:1), dando el producto **94** como un aceite amarillento (56 mg, 97%).

R_f : 0.37 en CH₃CN/H₂O (7:3).

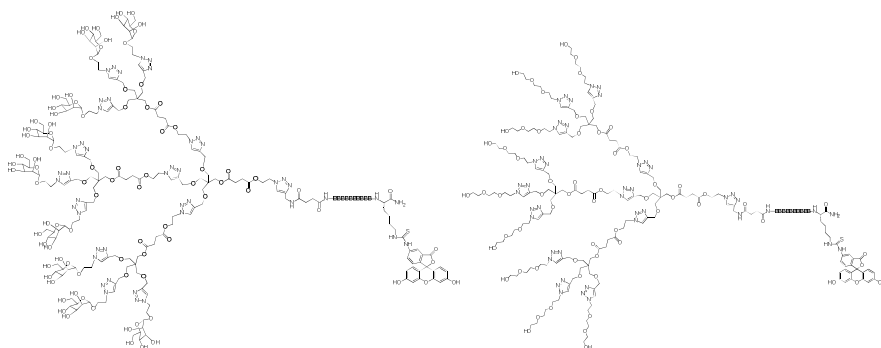
¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ = 7.99 (s, 12H, H_{triazol}), 4.67 (t, J= 4.7 Hz, 6H, COCH₂CH₂N_{triazol}), 4.62 - 4.43 (m, 48H, CH₂N_{triazol}, H₃, COCH₂CH₂N_{triazol}), 4.21 (t, J= 4.7 Hz, 2H, CH₂CH₂N₃), 4.06 (m, 8H, H₁), 3.88 (t, J= 4.2 Hz, 18H), 3.63-3.59 (m, 54H, CH₂CH₂OH, OCH₂CH₂O), 3.51-3.45 (m, 44H, CH₂OH, CH₂N₃, H₂), 2.58-2.52 (m, 16H, CH₂succínico).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD): δ = 173.6 (CO), 145.9 (C_{triazol}), 125.9 (CH_{triazol}), 73.7 (CH₂OH), 71.4 (OCH₂CH₂O), 71.4 (OCH₂CH₂O), 70.4 (CH₂CH₂N_{triazol}), 69.9 (CH₍₂₎), 65.4 (CH₍₃₎), 65.4 (CH₍₁₎), 64.6 (CH₂CH₂N₃), 62.2 (CH₂CH₂OH), 51.4 (CH₂N_{triazol}), 50.3 (CH₂N₃), 45.6 (C_{pentaeritritol}), 29.8 (CH₂succínico), 29.7 (CH₂succínico).

EM (ESI) calculado para C₁₃₄H₂₁₇N₃₉O₅₅ (m/z): 3252,5; encontrado: 3275.8 [M+Na]⁺, 1650.6 [M+2Na]²⁺, 1108.7 [M+3Na]³⁺.

EMAR calculado para C₁₃₄H₂₁₇N₃₉O₅₅: 3252.5382; encontrado: 1085.1860 [M+3H]⁺

7.3.6.3. Síntesis de Conjugados PNA-dendrón nonavalente

Protocolo general para la síntesis de conjugados PNA-dendrón (95-98)

Los dendrones **10** ò **94** (0.26 μmol) se disuelven en DMSO-Tampón fosfato sódico (100 mM, pH 7.4) (367.4 μL , 2:3 v/v) junto con el correspondiente PNA (**89-90**) (0.390 μmol). Posteriormente, se le añade una disolución de CuBr (1.6 μmol) en DMSO (52.4 μL) en cuatro porciones, añadiendo una cada media hora. Tras aproximadamente cuatro horas en agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se liofiliza y se purifica por RP-HPLC para dar los conjugados PNA-dendrón **95-98** con elevado porcentaje de conversión y moderados rendimientos (Tabla 21).

La purificación se lleva a cabo mediante RP-HPLC con una columna C18 Phenomenex semipreparativa (10 μ , 10 \times 250 mm) y un gradiente de 5 a 100 % de una disolución B en otra disolución A en 180 minutos a flujo de 0.9 mL/min, para el conjugado **95**. Para los conjugados **96** y **97**, se emplea un gradiente de 17 a 25 % de una disolución B en otra disolución A en 180 minutos a flujo de 0.9 mL/min. B corresponde a una disolución de TFA en CH₃CN al 0.1% y A a una de TFA en H₂O, también al 0.1%.

La caracterización de los compuestos se lleva a cabo por espectrometría de masas, tal y como se recoge en la siguiente tabla.

Compuesto	R %	Composición	PM [mo/av] (calculado)	PM (encontrado)
antifabI- Link₉ (95)	22%	C ₂₇₄ H ₃₈₃ N ₉₇ O ₉₄ S	6571.6/6567.8	6572.6
antifabI- Man₉ (96)	10%	C ₂₉₂ H ₄₀₁ N ₉₇ O ₁₂ ₁ S	7238.0/7233.8	7239.9
antiacpP- Man₉ (97)	22%	C ₂₉₂ H ₄₀₂ N ₉₄ O ₁₂ ₂ S	7212.9/7208.8	7214.9
antiacpP- Link₉ (98)	—	C ₂₇₄ H ₃₈₄ N ₉₄ O ₉₅ S	6546.6/6542.8	6545.7

Tabla 22. Conjugados PNA-dendrón sintetizados.



Anexo

1

*Estructuras y Abreviaturas
de Aminoácidos*

Abreviatura de una letra	Abreviatura de tres letras	Nombre	Estructura
A	Ala	Alanina	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
C	Cys	Cisteína	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array}$
D	Asp	Ácido aspártico	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$
E	Glu	Ácido glutámico	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$
F	Phe	Fenilalanina	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$
G	Gly	Glicina	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$
H	His	Histidina	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_4\text{H}_3\text{N} \end{array}$

I	Ile	Isoleucina	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $
K	Lys	Lisina	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $
L	Leu	Leucina	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $
M	Met	Metionina	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{S} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $
N	Asn	Asparagina	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $
P	Pro	Prolina	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HN} \quad \text{Cyclopentane ring} \end{array} $
Q	Gln	Glutamina	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $

R	Arg	Arginina	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{C}=\text{NH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $
S	Ser	Serina	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array} $
T	Thr	Treonina	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $
V	Val	Valina	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $
W	Trp	Triptófano	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{Indole ring} \end{array} $
Y	Tyr	Tirosina	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{Benzene ring} \\ \\ \text{OH} \end{array} $



Anexo

2

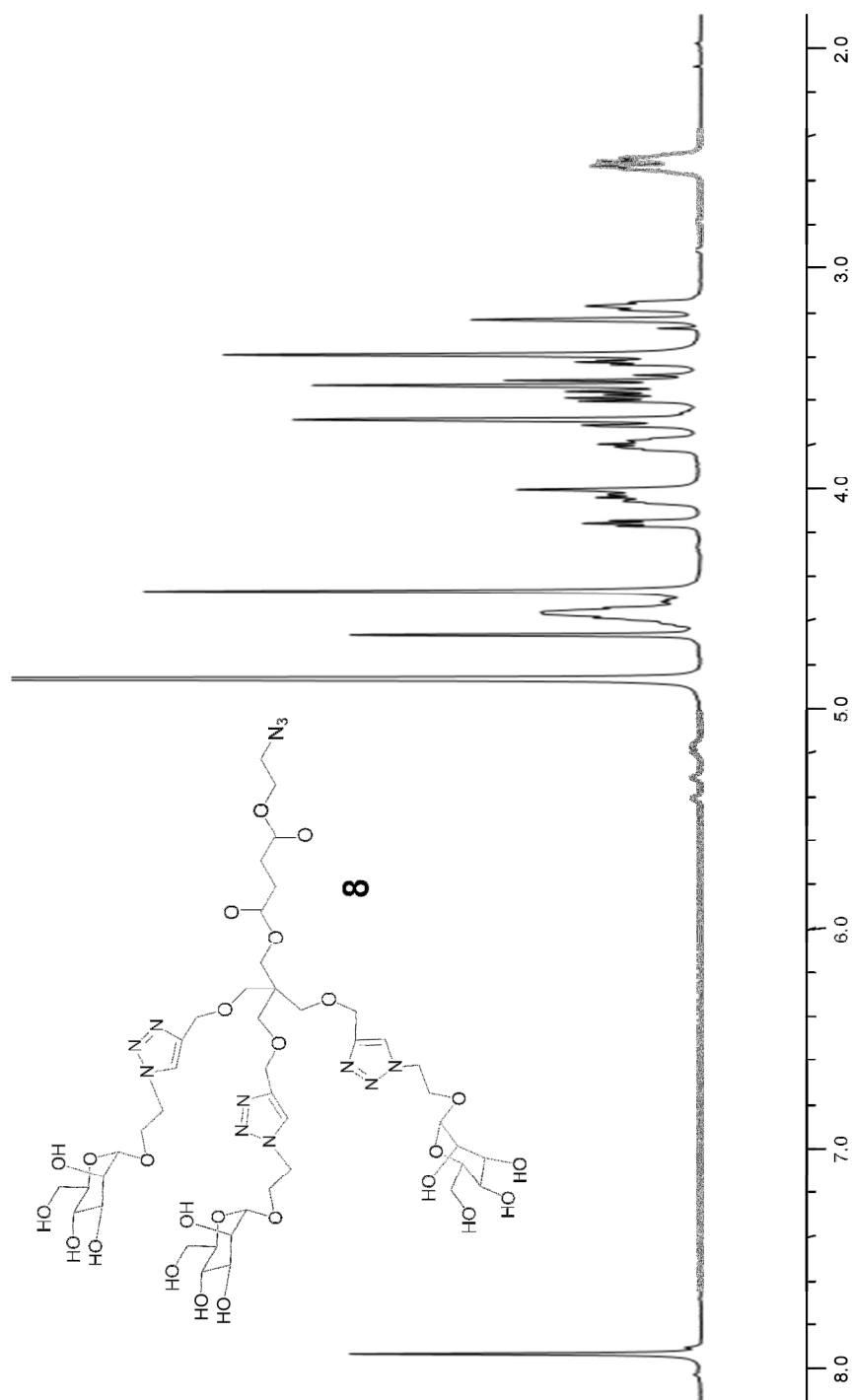
*Estructuras y Abreviaturas
de Nucleótidos*

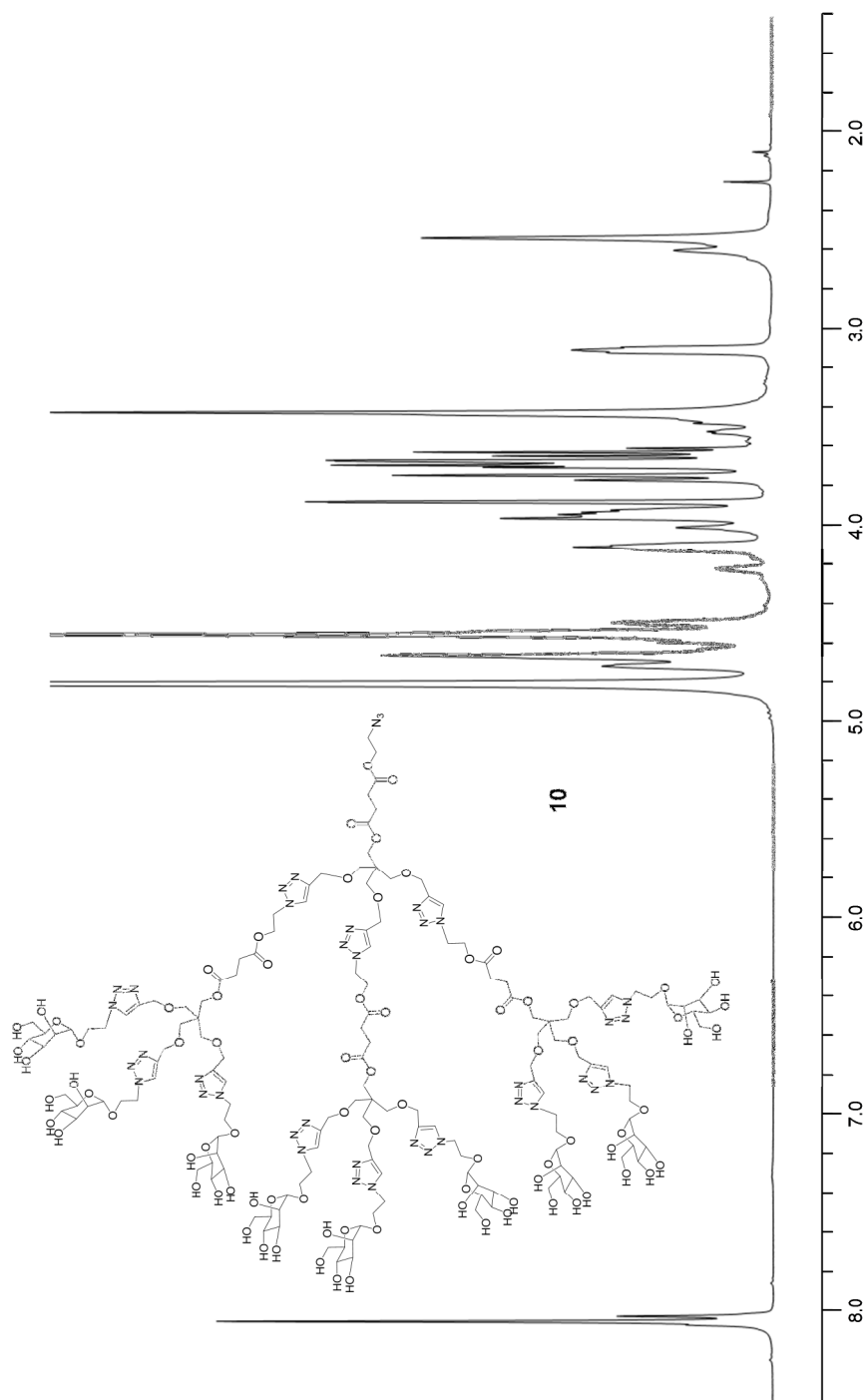
Abreviatura	Nombre	Estructura
A	Adenina	
G	Guanina	
C	Citosina	
T	Timina	

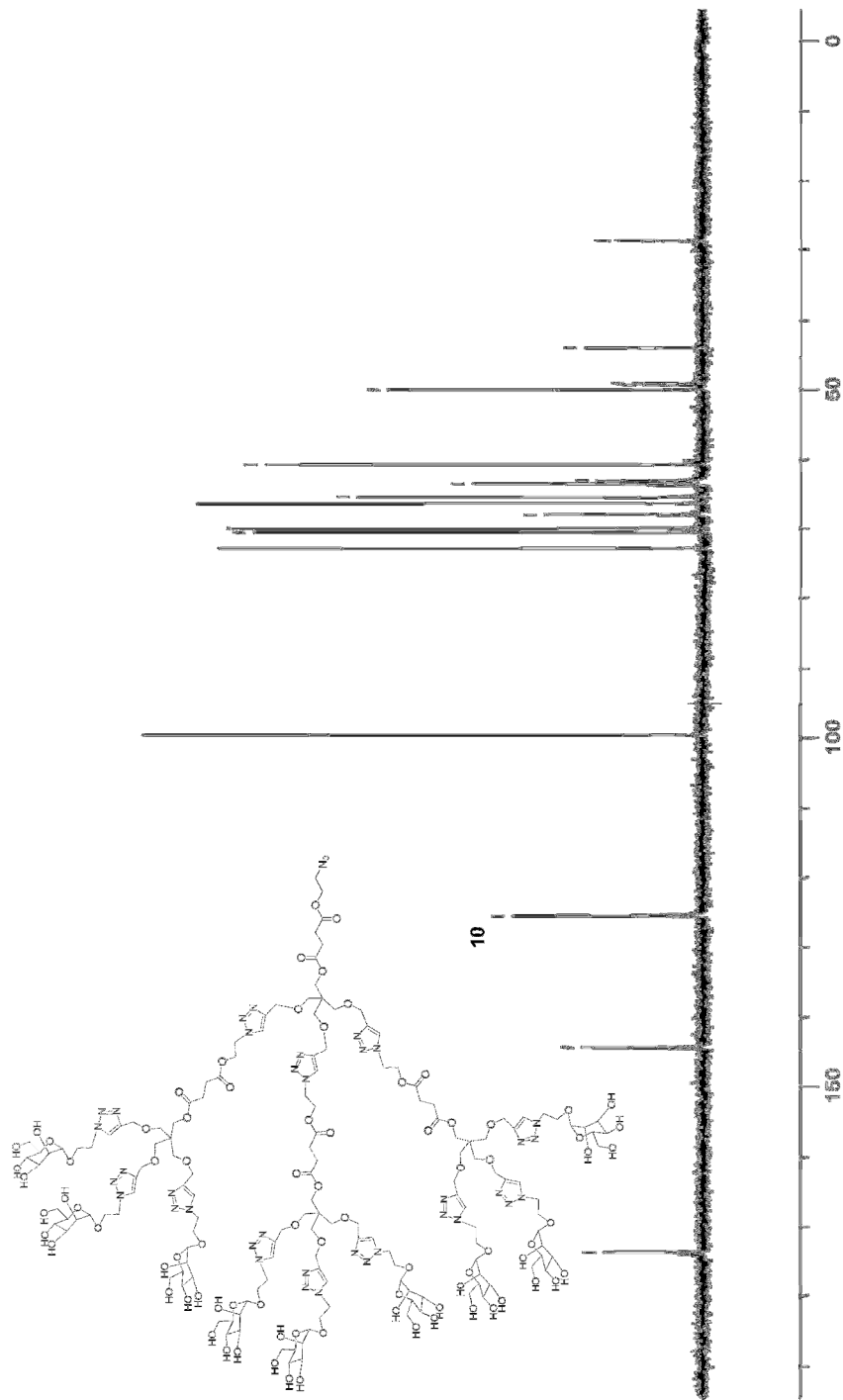
Anexo

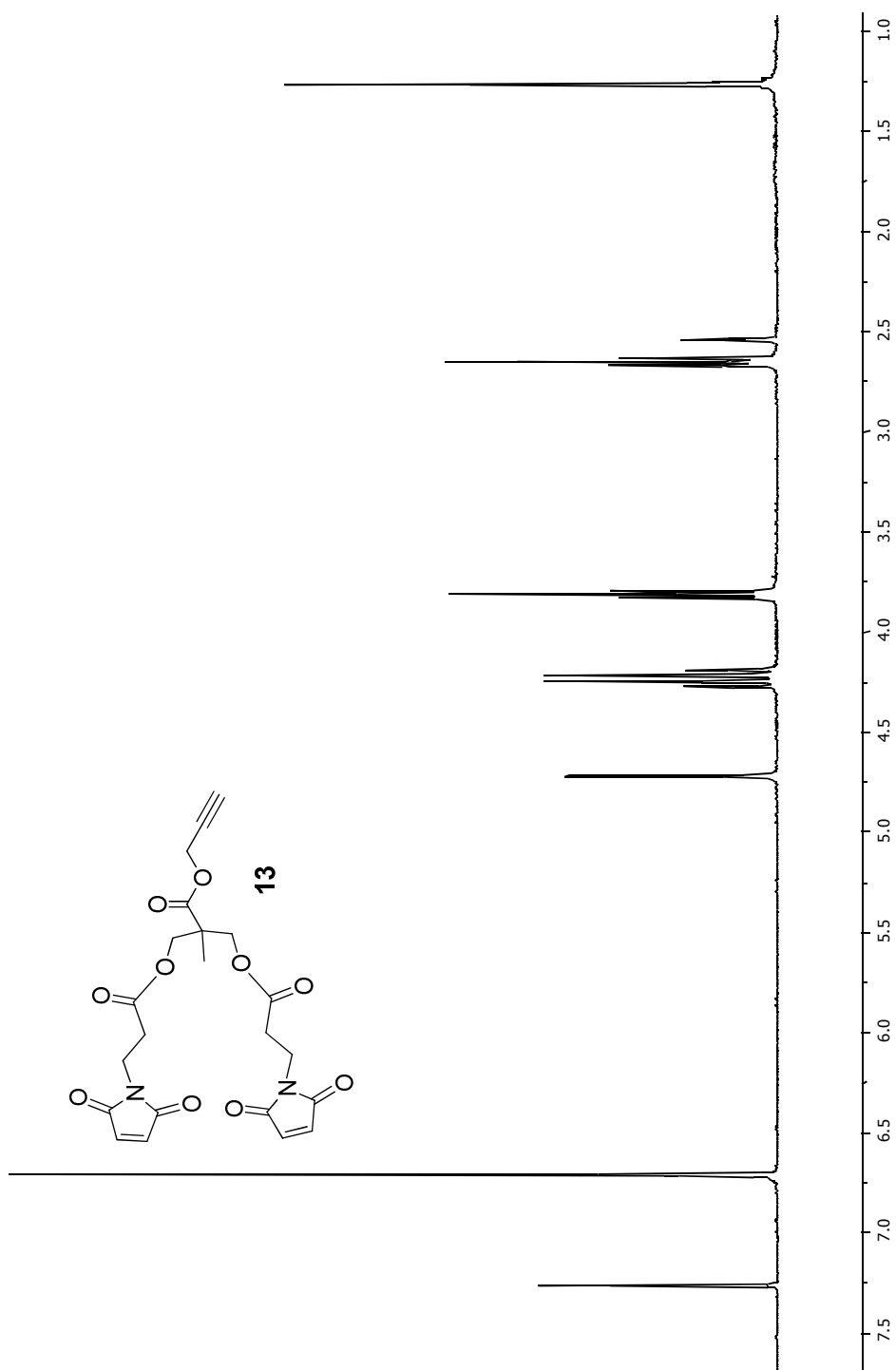
3

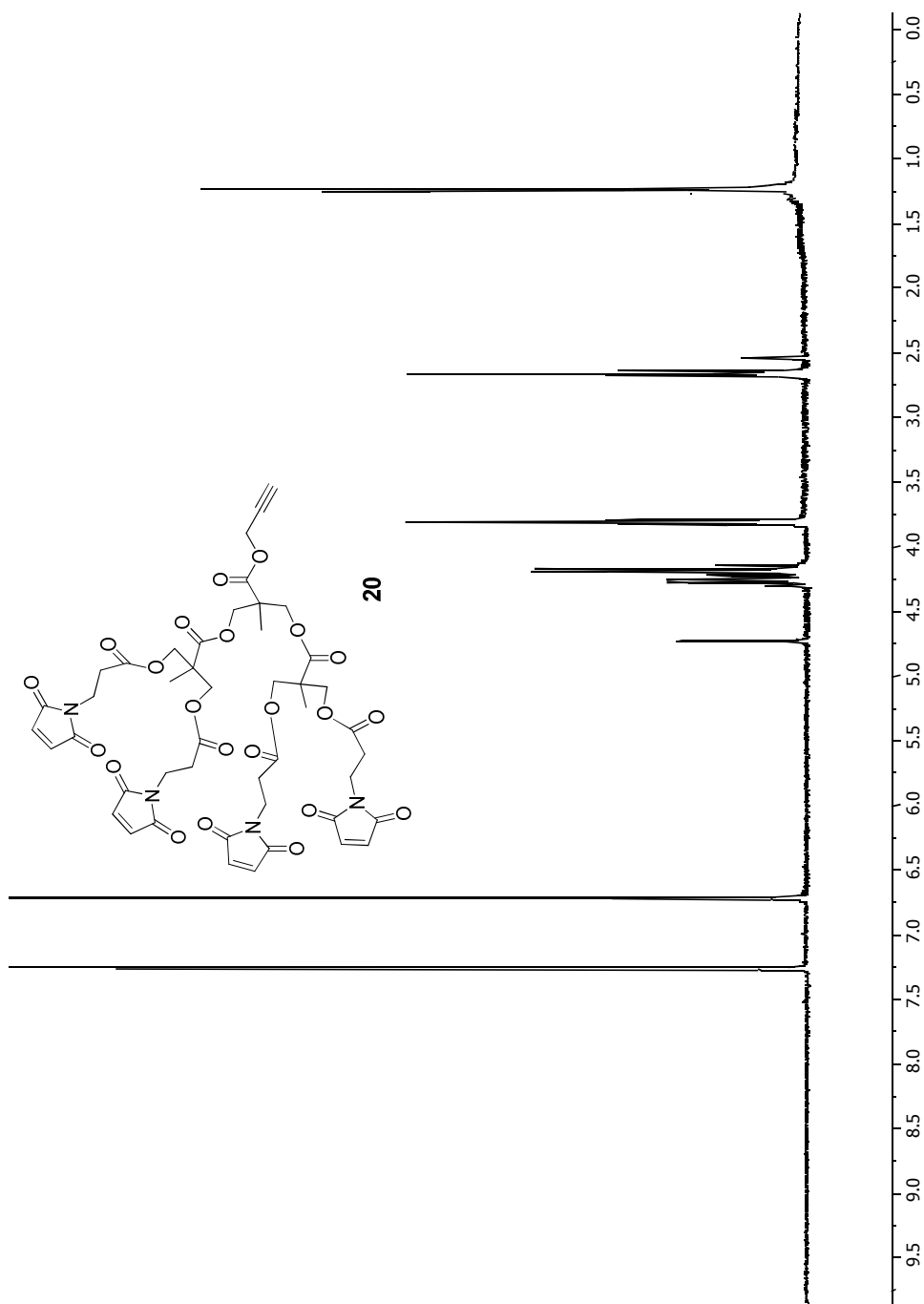
*Selección de
Espectros y
Cromatogramas*











ESI spectrum, deconvoluted.

100816_PRWK_3_XT_00001_M-Hp_#2 RT: 2.00 AM: 5.25E7
T: FTMS + c NSI Full ms [150.00-2000.00]

